

CARLOS EDUARDO SOARES SILVADO

Alterações no Músculo Gastrocnêmio de Ratos Desnutridos durante o Aleitamento

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna do Departamento de Clínica Médica, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Lineu César Werneck

**Curitiba
2006**

DEDICATÓRIA

Aos meus familiares e aos que me
ensinaram a arte da Neurologia.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Lineu César Werneck, amigo, mestre e sobretudo modelo de profissional e pesquisador, pela orientação e participação durante a elaboração desta tese.

Aos colegas da Disciplina de Neurologia do Departamento de Clínica Médica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná pelo companheirismo e apoio na execução deste trabalho.

Ao Professor Dr. Israil Cat pelo inestimável auxílio para a elaboração desta pesquisa.

Aos membros do Laboratório Experimental de Pediatra do Departamento de Pediatria da Universidade Federal de São Paulo, que disponibilizaram os espécimes para o estudo e facilitaram sobremaneira a realização do mesmo.

Aos meus familiares, particularmente a minha esposa Tânia, que muito colaboraram e incentivaram este trabalho, sobretudo pela paciência e compreensão com que suportaram as longas horas de afastamento durante a sua execução.

Aos técnicos do Laboratório de Histoquímica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná pelo sempre prestimoso auxílio no processamento dos espécimes.

A todos, que apesar de não citados nominalmente, acreditaram no sucesso desta empreitada e tiveram paciência para aguardar a sua conclusão.

SUMÁRIO

<u>1</u>	<u>Introdução</u>	1
1.1	<u>A Desnutrição Energético-Proteíca</u>	2
1.2	<u>Classificação da Desnutrição Energético-Proteíca</u>	4
1.3	<u>Alterações Sistêmicas na Desnutrição Energético-Proteíca</u>	5
1.4	<u>Alterações Musculares na Desnutrição Energético-Proteíca</u>	7
1.4.1	<u>Alterações Musculares em Crianças Desnutridas</u>	8
1.4.2	<u>Alterações Musculares em Adultos Desnutridos</u>	120
1.4.3	<u>Alterações Musculares em Ratos Desnutridos</u>	12
1.5	<u>Estudo Histoquímico do Músculo</u>	1715
1.5.1	<u>Análise Histoquímica da Fibras Musculares</u>	17
1.5.2	<u>Tipos de Fibras Musculares pela ATPase Miofibrilar</u>	18
1.5.3	<u>Diferenciação dos Tipos de Fibras Musculares no Homem</u>	21
1.5.4	<u>Diferenciação dos Tipos de Fibras Musculares no Rato</u>	22
1.5.5	<u>Análise Quantitativa do Tamanho e Padrão de Distribuição das Fibras Musculares</u>	24
1.5.6	<u>Evolução do Diâmetro das Fibras Musculares</u>	28
1.6	<u>O Músculo Gastrocnêmio do Rato</u>	28
<u>2</u>	<u>Objetivo</u>	32
<u>3</u>	<u>Material e Métodos</u>	34
3.1	<u>Animal de Experimentação</u>	35
3.1.1	<u>Manejo do Animal de Experimentação</u>	35
3.1.2	<u>Obtenção do Animal de Experimentação</u>	35
3.1.3	<u>Caracterização da Gravidade da Desnutrição</u>	41
3.2	<u>Retirada do Músculo Gastrocnêmio</u>	41

3.3	<u>Técnicas de Coloração à Fresco e Histoquímica Muscular</u>	42
3.4	<u>Tipos de Alterações Histológicas Analisadas</u>	43
3.5	<u>Identificação dos Tipos de Fibras Musculares</u>	45
3.6	<u>Análise Histográfica da Área das Fibras Musculares</u>	45
3.7	<u>Análise Estatística</u>	48
4	<u>Resultados</u>	50
4.1	<u>Alterações Musculares Histoquímicas e Colorimétricas</u>	51
4.2	<u>Análise Histográfica dos Tipos de Fibras Musculares</u>	53
4.2.1	<u>Área das Fibras Tipo 1</u>	54
4.2.2	<u>Área das Fibras Tipo 2a</u>	55
4.2.3	<u>Área das Fibras Tipo 2b</u>	56
4.2.4	<u>Área de Todas as Fibras</u>	57
4.3	<u>Frequência dos Tipos de Fibras em Relação a Área das Fibras Musculares</u>	57
5	<u>Discussão</u>	62
5.1	<u>DEP exclusivamente durante o aleitamento</u>	63
5.2	<u>Alterações Histoquímicas e Colorimétricas no Músculo</u>	65
5.3	<u>Variação da Área e Distribuição das Fibras Musculares</u>	65
6	<u>Conclusões</u>	69
7	<u>Referências</u>	71

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1.1 - Alterações musculares em crianças com DEP grave</u>	11
<u>Tabela 1.2 - Alterações por histoquímica muscular em ratos com DEP</u>	16
<u>Tabela 1.3 - Principais reações histoquímicas e colorimétricas</u>	18
<u>Tabela 1.4 - Tipos de fibras musculares no homem</u>	21
<u>Tabela 1.5 - Perfis histoquímicos das fibras musculares de ratos</u>	24
<u>Tabela 3.1 - Ganho de peso das ratas-mãe</u>	36
<u>Tabela 3.2 - Ganho de peso dos ratos - grupo Controle</u>	38
<u>Tabela 3.3 - Ganho de peso dos ratos - grupo Desnutrido</u>	39
<u>Tabela 3.4 - Evolução do peso médio dos ratos</u>	41
<u>Tabela 4.1 - Número de fibras musculares medidas - ATPase 4.3</u>	5154
<u>Tabela 4.2 - Área das fibras tipo 1 - ATPase 4.3</u>	5454
<u>Tabela 4.3 - Área das fibras tipo 2a - ATPase 4.3</u>	5555
<u>Tabela 4.4 - Área das fibras tipo 2b - ATPase 4.3</u>	56
<u>Tabela 4.5 - Área de todas as fibras - ATPase 4.3</u>	57
<u>Tabela 4.6 - Distribuição dos tipos e área media das fibras musculares</u>	58
<u>Tabela 4.7 - Frequência das tipos em relação a área das fibras musculares</u>	59

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura 1.1 - Causas da desnutrição infantil</u>	3
Figura 1.2 - Zonas do músculo gastrocnêmio do rato	31
Figura 3.1 - Ganho de peso das ratas-mãe.....	37
Figura 3.2 - Tipos de fibra muscular (ATPase 4.3).....	46
Figura 3.3 - Fotografia da escala micrométrica padrão	47
Figura 3.4 - Tela quadriculada para medida da área das fibras musculares.....	47
<u>Figura 4.1 - Lipídios no interior da fibra muscular</u>	5352
<u>Figura 4.2 - Fuso muscular e tipos de fibras</u>	53
5353 <u>Figura 4.3 - Distribuição por tipos de fibras musculares (ATPase 4.3)</u>	60
<u>Figura 4.4 - Distribuição dos tipos de fibras musculares por grupo (ATPase 4.3)</u>	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ATPase – adenosina trifosfatase

BB – bíceps braquial

CON – grupo Controle

DEP – desnutrição energético-protéica

DES – grupo Desnutrido

ELD – extensor longo dos dedos

EMG – eletromiografia

GAS – gastrocnêmio

HE – hematoxilina-eosina

ME – microscopia eletrônica

NADH - nicotinamida adenina dinucleotídio

NADH – TR – NADH tetrazolium redutase

OAA – Organização de Alimentos e Agricultura (FAO)

OMS – Organização Mundial de Saúde (WHO)

ORO – óleo vermelho O (“oil red O”)

PAS – ácido periódico de Schiff

SDH – desidrogenase succínica

SOL – sóleo

TA – tibial anterior

VCNM – velocidade de condução nervosa motora

RESUMO

A Desnutrição Energético-Protéica (DEP) provoca alterações significativas nos vários órgãos e sistemas do organismo, conforme o período de desenvolvimento corporal onde ocorre, a duração e gravidade do comprometimento. Os estudos de DEP em ratos, realizados durante o período de gestação e aleitamento, seguidos ou não de períodos de recuperação nutricional, demonstraram redução da área da seção transversa da fibra muscular e retardo na diferenciação dos tipos de fibras, não sendo possível precisar em qual destes períodos o músculo é mais susceptível as alterações ocasionadas pela DEP.

Durante o aleitamento, particularmente em ratos, ocorre um grande crescimento corporal, com maturação acelerada do sistema nervoso central e da musculatura esquelética. Para elucidar as consequências da DEP nos músculos de ratos recém-natos, desnutrido exclusivamente durante este período, nos analisamos com métodos histoquímicos e quantitativos o músculo gastrocnêmico de 15 ratos eutróficos ao nascimento e desnutridos por redução da ingesta de leite até o 24º dia de vida (grupo Desnutrido – DES), comparados com 15 ratos eutróficos (grupo Controle – CON). O peso médio dos ratos desnutridos era 33% inferior ao dos ratos eutróficos no 24º de vida, configurando uma DEP moderada, segundo os critérios de Gomez.

As principais alterações encontradas na análise por métodos histoquímicos e colorimétricos processados a fresco em ambos os grupos foram variações no diâmetro das fibras musculares. A única diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0002$) foi uma discreta redução de lipídios no interior das fibras musculares em 5 ratos CON e em todos os 15 ratos DES.

Nos ratos desnutridos, a área média da seção transversa da fibra do músculo gastrocnêmio, corada pela ATPase 4.3, encontra-se significativamente reduzida nas fibras tipo 2. A frequência de distribuição dos tipos de fibra em relação à área evidencia uma redução da área para as fibras do tipo 2, não sendo significativo para as fibras tipo 1. O histograma de frequência dos tipos de fibras apresenta-se desviado para a esquerda, confirmando o predomínio de fibras de menor área no grupo DES.

A DEP durante o período de aleitamento pode induzir um retardo na maturação das fibras musculares de ratos, porém sem alterações estruturais significativas.

ABSTRACT

Protein-energy undernutrition (PEU) may cause significant alterations in various organs and systems. Those vary accordingly to the body corporal development stage, as well as, PEU duration and severity. Studies in rats, with PEU occurring during both the pregnancy and suckling periods, followed or not by nutritional recovering, showed reduction of cross-section muscle fiber area and retardation in the differentiation of fiber types. Which of these periods is related to the highest muscle damaging secondary to PEU remains unclear.

In rats, the suckling period is reportedly associated with intense body growing and fast maturation of central nervous system and skeletal muscles. To elucidate the consequences of PEU during the suckling period in the muscle of newborn rats, we used qualitative and quantitative histochemical methods to evaluate the gastrocnemius muscle of 15 rats, undernourished by reduction of milk intake from the first to 24th day of life (Undernourished Group – UND), compared to 15 euthrofic rats (Control Group – CON). The medium weight of UND was 33% lower compared to the CON at 24th day of live, suggesting a moderate PEU, according Gomez's Classification.

The main alteration found by histochemical and colorimetric methods using fresh sections was the variation in the muscle fiber diameter. The only statistically significant difference ($p = 0,0002$) was a discrete reduction in lipids in the fibers, found in 5 of the CON and all UND.

In the UND rats the mean cross-section fiber area of the gastrocnemius muscle, stained at ATP-ase 4.3, was significantly reduced for type 2 fibers. The distribution frequency of fiber types in relation to area showed a reduction in type 2 fibers, which was not significant to type 1 fibers. The histogram of distribution of various fiber types showed curves skewed to left (smaller area fibers) indicating smaller fiber area in the UND group.

The PEU during the suckling period may induce retardation in the maturation of rat muscle fibers, which is not necessarily associated with significant structural changes.

Introdução

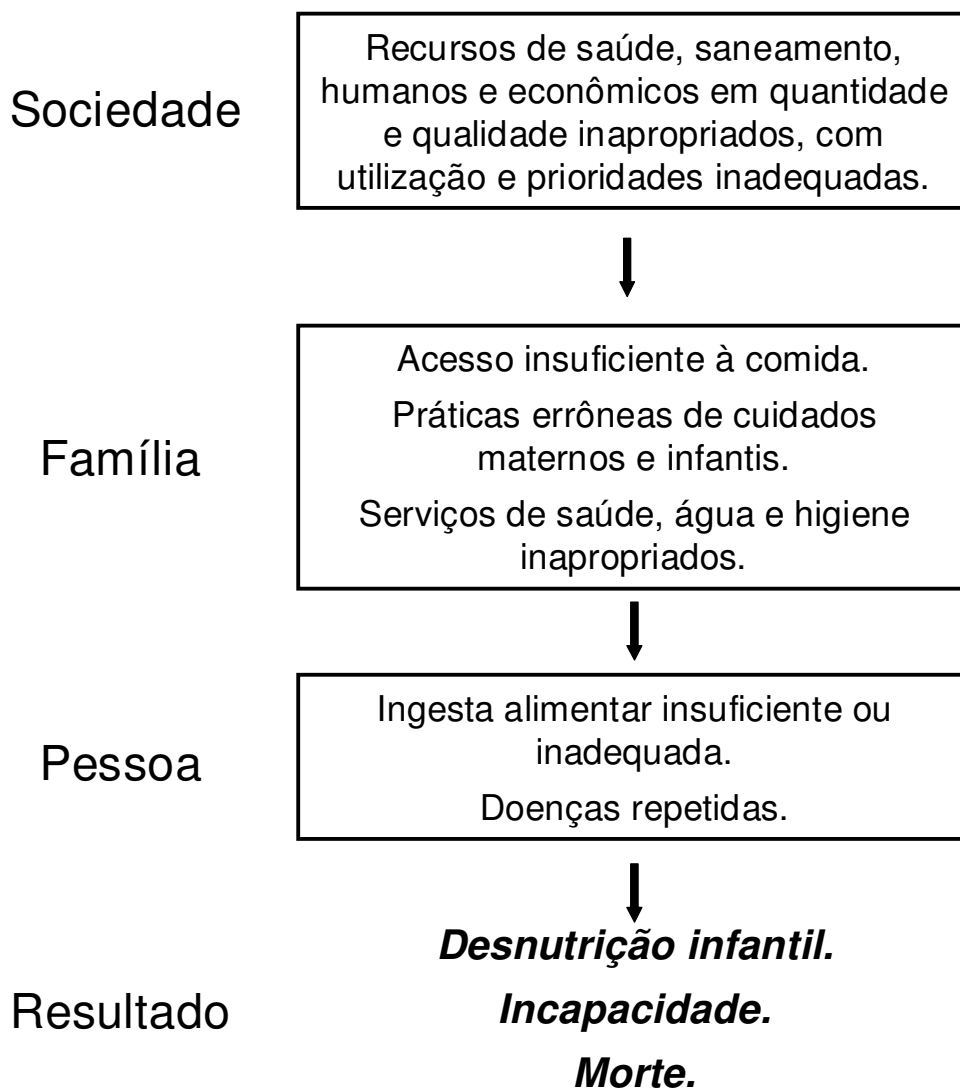
“Desnutrição Energético-Protéica afeta 1/4 das crianças no mundo:
30 milhões apresentam baixo peso ao nascimento pela pobre nutrição durante vida fetal;
182 milhões (33%) estão com retardo do crescimento;
150 milhões (27%) estão abaixo do peso esperado.”
[Global Database on Child Growth and Malnutrition 2002]

1.1 A Desnutrição Energético-Proteica

A Desnutrição Energético-Proteica (DEP) é definida pela Organização de Alimentos e Agricultura (OAA) e Organização Mundial de Saúde (OMS) como “uma variedade de condições patológicas decorrentes das deficiências de energia e proteínas em proporções variadas, que atingem preferencialmente as crianças, sempre agravadas pelas infecções repetidas”. A DEP está provavelmente associada à metade das 10,4 milhões de mortes de crianças que ocorrem a cada ano. Lactentes e crianças jovens são mais susceptíveis a manifestação mais típica da DEP - o retardo do crescimento, devido às elevadas demandas protéicas e energéticas e a vulnerabilidade à infecções. Globalmente, crianças desnutridas sofrem até 160 dias de doença a cada ano, com a desnutrição ampliando o efeito de todas as doenças. Mortalidade de até 30% não é incomum, mas com manejo adequado, ela pode ser reduzida para menos de 5% [ACC/SNC e IFPRI 2000].

A DEP é uma entidade clínica freqüente em nosso meio e também em outros países com problemas de subdesenvolvimento, baixa renda *per capita*, saneamento básico precário e más condições de atendimento de saúde ao grupo materno infantil (Figura 1.1). Atinge principalmente mulheres em gestação ou lactação e crianças menores de cinco anos de idade que, devido à acelerada velocidade de crescimento, têm requerimentos de nutrientes proporcionalmente elevados [Monckeberg 1985]. Ocorre num ciclo vicioso iniciado com a pobreza, acentuada pela ignorância do desmame precoce e dos erros alimentares e precipitada pelas infecções ocasionadas pelas más condições higieno-dietéticas, como as gastroenterites, culminando na desnutrição [Palma e Fisberg 1994].

Causas da Desnutrição Infantil



Adaptado de ACC/SCN e IFPRI 2000

Figura 1.1 - Causas da Desnutrição Infantil

O estado nutricional é o melhor indicador global do bem estar da criança, podendo ser avaliado pela relação estatura *versus* idade. É o indicador que melhor reflete os efeitos acumulativos de longo prazo de uma dieta inadequada e/ou doenças recorrentes, que se manifestam pelo retardo de crescimento. Em 1986, OMS implantou o Banco de Dados Global em Crescimento Infantil e Desnutrição (WHO Global Database on Child Growth and Malnutrition). A análise realizada por Onis e colaboradores neste banco de dados, abrangendo os resultados de 241 pesquisas realiza-

das em 106 países em desenvolvimento em crianças abaixo de 5 anos, mostrou uma redução no retardo do crescimento nos países em desenvolvimento de 47% em 1980 para 33% em 2000. Estima-se que esta tendência à queda prossiga, e que no ano de 2005 apenas 29% das crianças estejam comprometidas [Onis e col. 2000]. Esta melhora não ocorreu de forma homogênea em todos os países. O retardo do crescimento aumentou na África Ocidental e reduziu na Ásia, América do Sul e Norte da África. No Caribe, América Central e África Oriental sofreu poucas alterações. Para o ano de 2000 estima-se existirem 182 milhões de crianças pré-escolares com retardo do crescimento nos países em desenvolvimento. Apesar da melhora global do retardo do crescimento, a desnutrição na infância permanece ainda como um dos grandes problemas de Saúde Pública nestes países [ACC/SCN e IFPRI 2000].

Dados do Banco Mundial, referentes ao Brasil em 1986, revelam que apenas 33% da população recebem alimentação suficiente. Na região Nordeste, 79% da população têm alimentação deficiente em calorias, ocorrendo o mesmo em 58% da população da região Sul-Sudeste [Ferrari 1986]. Em 1996, na população brasileira com idade inferior a 5 anos de vida, 10,5% apresentavam retardo no crescimento e 5,7% peso inferior ao esperado para a idade [Global Database on Child Growth and Malnutrition 2000].

Apesar da melhoria das condições nutricionais das crianças no Brasil, a desnutrição é mais freqüente nas áreas rurais do Norte e Nordeste e nas periferias das grandes cidades e preocupante nas regiões mais pobres do país e nos bolsões de pobreza das grandes cidades [Rede de Combate à Desnutrição Infantil 2006]. Em nosso meio o controle da DEP deve ser priorizado pela alta prevalência, e elevada mortalidade e possíveis seqüelas físicas e mentais [Hoffmann 1995, Monckeberg 1985, Palma e Fisberg 1994].

1.2 Classificação da DEP

Dentre as várias classificações para graus de desnutrição destacam-se a de Gómez e a da *Welcome Trust Working Party*.

A Classificação de Gómez, define três níveis de desnutrição conforme o peso corporal encontrado em relação ao peso corporal esperado para a idade [Gómez e col. 1956]:

1º Grau ou Leve – peso corporal 10 a 24% abaixo do esperado.

2º Grau ou Moderada – peso corporal 25 a 39% abaixo do esperado.

3º Grau ou Grave – peso corporal 40% abaixo esperado.

A Welcome Trust Working Party é uma classificação utilizada principalmente para as desnutrições graves, definindo quatro níveis de desnutrição [Welcome Trust Working Party 1970]:

Baixo Peso – peso corporal entre 60 a 80% do esperado para a idade e ausência de edema

Marasmo - peso corporal abaixo de 60% do esperado para a idade e ausência de edema

Kwashiorkor - peso corporal entre 60 a 80% do esperado para a idade e presença de edema

Kwashiorkor Marasmático - peso corporal abaixo de 60% do esperado para a idade e presença de edema.

1.3 Alterações Sistêmicas na DEP

A DEP provoca alterações significativas nos vários órgãos e sistemas do organismo, inclusive na musculatura esquelética.

A interação dos vários fatores ligados ao ambiente e a criança resultam na redução da ingestão de alimentos. A carência prolongada de alimentos leva o organismo a adaptar-se gradativamente para poder sobreviver. A primeira alteração é o aumento da proporção de água e sódio total nos vários compartimentos, acompanhada pela deficiências de potássio, cálcio, magnésio, fosfato, zinco e cobre. Estas alterações bioquímicas são seguidas por modificações nas funções dos órgãos e sistemas, culminando com transformações na estrutura histológica de todos os tecidos [Palma e Fisberg 1994]. A redução da massa tissular contribui para a redução do peso do organismo e não ocorre proporcionalmente em todos os órgãos e sistemas [Jackson e col. 1986]. As principais disfunções ocorrem nos sistemas enzimáticos, nos hormônios hipofisários, no desenvolvimento neuropsicomotor e no sistema imunológico. Estas alterações são, por vezes, irreversíveis [Palma e Fisberg 1994].

No sistema gastrointestinal a DEP desencadeia graus variados de atrofia da mucosa intestinal e de redução das enzimas digestivas, principalmente da lactase, favorecendo a proliferação bacteriana, além de prejudicar a digestão e absorção de gorduras e carboidratos, mais acentuadamente que de proteínas. A má absorção intestinal e as diarreias freqüentes perpetuam as perdas e agravam o quadro. A função imunológica celular é bastante comprometida, com redução dos fatores humorais responsáveis pela fagocitose e imunoglobulina A. A anemia que ocorre está mais relacionada a deficiência protéica que à carência de ferro [Carazza 1991].

O Sistema Nervoso Central apesar de ser um órgão relativamente poupado dos agravos nutricionais quando comparado aos outros órgãos, poderá ser gravemente comprometido pela DEP na infância, pois é atingido na sua fase de crescimento mais rápido. Este déficit poderá ser permanente, mesmo após a correção da DEP, levando o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) a estimar que 15% da população brasileira teriam seu potencial intelectual reduzido pela deficiência nutricional, mesmo se vierem a receber suplementação alimentar [Ferrari 1986]. Carazza considera que, apenas na DEP intra-útero, há uma grande possibilidade de ocorrer lesão grave e permanente do sistema nervoso central proporcional ao grau de desnutrição. Esta lesão seria responsável pelo retardo no desenvolvimento neuropsicomotor destas crianças, e pode ser revertida, com um ambiente sócio-cultural favorável e estimulação psicomotora adequada [Carazza 1991].

Em crianças, o período de mais rápido crescimento ocorre nos primeiros seis meses de vida. O grau de crescimento é determinado principalmente por fatores genéticos, podendo ser alterado por fatores ambientais, particularmente a nutrição. Crianças que nascem pequenas podem acelerar compensatoriamente o desenvolvimento até alcançarem a sua curva de crescimento geneticamente determinada (“catch up”). Crianças que nascem grandes podem retardar o crescimento (“catch down”) pelo mesmo motivo. No entanto é essencial o aporte adequado de nutriente para permitir o este crescimento compensatório [Zotlin 1991].

Dentre os vários fatores capazes de influírem no crescimento e no estado nutricional do recém nascido destacam-se a duração da gestação, o sexo, o número de fetos na mesma gestação, a idade materna, o número de gestações prévias, a ordem do nascimento, o nível social, o estado nutricional materno e o uso de fumo e outras drogas [Barbieri e col. 1994].

O estudo do cérebro de ratos submetidos a DEP do nascimento até o 27º dia de vida mostrou que as estruturas cerebrais não sofreram alterações nos níveis de neurônios, fibras mielínicas e corpúsculos de Nissl, com redução significativa das proteínas e dos lipídios cerebrais. Após a recuperação nutricional ocorre recuperação completa do conteúdo protéico e parcial do conteúdo lipídico, sugerindo que a DEP nesta fase do desenvolvimento constitui uma agressão importante, podendo levar a alterações metabólicas cerebrais irreversíveis, mesmo após um período de recuperação nutricional [Kfoury e col. 1977, Tonete e col. 1981].

Crianças com vários graus de desnutrição apresentam um aumento da latência cortical e do tempo de condução motora central, com um limiar baixo de excitabilidade cortical para os músculos abdutor curto do polegar e extensor curto dos dedos após estimulação transmagnética do córtex motor cerebral, quando comparado com crianças normais. Estas alterações são mais acentuadas nos casos com desnutrição mais grave e indicam uma disfunção da condução motora, possivelmente relacionada a um retardo na maturação [Tamer e col. 1997].

1.4 Alterações Musculares na DEP

A musculatura esquelética é o maior reservatório de proteína do corpo, representando 42% da massa corporal. O músculo é composto por proteínas (20%), lipídios (5%), carboidratos (1%), constituintes orgânicos e inorgânicos (2%) e água (72%) [Ontko 1994]. Durante o repouso, o músculo é responsável por 33% do consumo total de oxigênio corporal, taxa que se eleva até 96% durante os períodos de atividade muscular intensa [Adibi e col. 1974].

O metabolismo muscular regula-se, de forma rápida e precisa, a quaisquer mistura de carboidratos, gorduras e proteínas consumidos na dieta. Desta forma mantém o estado funcional, mesmo nas situações de desnutrição aguda ou crônica [Ontko 1994]. Ratos jovens submetidos a uma dieta sem proteína apresentam uma parada de crescimento da massa muscular esquelética e do seu conteúdo protéico, com uma surpreendente preservação da musculatura, reduzindo a proteólise de forma ainda não bem definida [Nascimento e col. 1990, Tawa e Goldberg 1994].

1.4.1 Alterações Musculares em Crianças Desnutridas

O estudo mais abrangente das alterações neuromusculares na DEP foi efetuado por Dastur e colaboradores (1982) em 52 crianças com DEP de grau II e IV, que apresentavam uma redução da força muscular com predomínio proximal e hipotonia generalizada. A microscopia óptica de seções em parafina de biópsias musculares mostrou uma redução generalizada e não específica das fibras em 37 (71,1%), com presença de grupos atróficos, sugerindo denervação em cinco (9,6%), variação do diâmetro e fibras arredondadas, sugestivas de miopatias em quatro (7,7%). Nenhuma anormalidade foi observada em seis (11,5%) biópsias. Em apenas cinco casos foi realizado estudo histoquímico, sendo constatado em três deles a ausência de distinção entre os tipos de fibra muscular até os três anos de idade. O diâmetro médio das fibras musculares de desnutridos com cinco e dez anos de idade foi comparável ao diâmetro médio de crianças normais de 6 meses até 2 anos e 6 meses de idade. A microscopia eletrônica (ME) realizada em sete biópsias, demonstrou fibras pouco desenvolvidas com miofibrilas compactamente arranjadas e fibras pequenas ou normais, com graus variados de desorganização e degeneração. Estas alterações indicam uma lentificação ou retardo do desenvolvimento das fibras musculares em relação ao esperado para a idade. Estes achados eram semelhantes ao observado nas fibras musculares fetais na ME. Concluiu enfatizando o valor da utilização da medida do diâmetro das fibras musculares no estudo das alterações musculares em distúrbios metabólicos como a DEP em relação às observações meramente qualitativas das fibras [Dastur e col. 1979].

O estudo da eletromiografia (EMG) em 18 crianças desnutridas revelou a presença de um padrão miopático em 10 casos e fibrilações em oito. A velocidade de condução nervosa motora (VCNM) era reduzida, normalizando com a recuperação nutricional [Sachdev e col. 1981].

A VCNM foi também estudada nos nervos ulnar, mediano, fibular e tibial posterior de 51 crianças com desnutrição crônica e 42 crianças normais, cujas idades variavam de seis meses a quatro anos, com redução significativa da VCNM nas porções distais dos nervos. A preservação das latências distais sugere que a DEP provoca uma mielinização inadequada dos nervos periféricos, principalmente nos segmentos distais [Kumar e col. 1977, Singh e col. 1976].

Os músculos sartório, obtidos nas necropsias de seis crianças com óbito por DEP grave e idades entre seis e 16 meses, mostraram redução na área das fibras musculares de até 50% em todos os casos [Montgomery 1962]. Aparentemente, apenas na situação de óbito causado pela desnutrição, ocorre uma redução do número de fibras musculares, pois em outros estudos com crianças desnutridas e recuperadas, a quantidade de fibras musculares permaneceu constante durante a DEP e recuperação [Hansen-Smith e col. 1978 e 1979].

Nassar e colaboradores estudaram, utilizando microscopia eletrônica, as alterações musculares em quatro crianças menores de dois anos de idade com desnutrição grave - marasmo. As anormalidades encontradas sugerem que todos os elementos estruturais do músculo são afetados, sendo o maior comprometimento nos elementos contráteis [Nassar e col. 1974].

Estudos realizados no material obtido por biopsia percutânea por agulha no músculo vasto lateral de 25 crianças com desnutrição grave, que foram repetidas após a recuperação nutricional, mostraram que durante a fase de desnutrição ocorreu manutenção do número de núcleos de fibras musculares e redução importante do diâmetro das fibras. Durante a fase inicial de recuperação nutricional as fibras dobraram de tamanho. Após a normalização do estado nutricional, as fibras musculares atingiram apenas 60% do diâmetro médio das fibras musculares de crianças nutridas de idade equivalente [Hansen-Smith e col. 1979].

A massa muscular total, medida com creatinina marcada com Nitrogênio¹⁵, demonstra que a reposição da massa muscular ocorrida durante a fase de recuperação nutricional deve-se a combinação de hipertrofia com hiperplasia muscular [Reeds e col. 1978].

A análise química da composição corporal total de duas crianças que morreram devido à desnutrição mostrou uma redução no conteúdo de potássio e de proteína, com aumento do conteúdo de água [Haliday 1967].

Os resultados dos principais estudos de DEP em crianças estão condensados na Tabela 1.1. Existem relativamente poucos pacientes estudados (em torno de 120), principalmente pelas limitações éticas e metodológicas envolvidas neste tipo de investigação.

1.4.3 Alterações Musculares em Adultos Desnutridos

Existem poucos estudos com avaliação histoquímica e morfológica da musculatura de adultos desnutridos.

Lancellotti e colaboradores realizaram biopsia do músculo deltóide processada por métodos histoquímicos em 24 pacientes adultos, com graus variados de desnutrição, sendo 14 portadores de carcinoma e 10 de doenças não neoplásicas. Observaram alterações musculares sugestivas de atrofia neurogênica, com fibras atróficas angulares do tipo 2, em 23 casos. A atrofia era mais intensa nos casos com desnutrição mais grave. Em oito casos ocorreram agrupamentos de um único tipo de fibra. Em apenas um caso ocorreu miosite aguda perimisial, que era sugestiva de comprometimento paraneoplásico. Não houve correlação entre a intensidade das alterações histoquímicas e a presença ou não de neoplasia [Lancellotti e col. 1988].

Lopes e colaboradores estudaram 10 adultos desnutridos por várias doenças gastrointestinais, comparando-os com 22 adultos normais. Observou aumento na fadigabilidade muscular e alteração no padrão de contração e relaxamento muscular em 10 desnutridos. Na reavaliação, efetuada após quatro semanas de nutrição parenteral total em quatro desnutridos, ocorreu uma recuperação significativa destes parâmetros [Lopes e col. 1982].

Tabela 1.1 - Alterações na musculatura esquelética em crianças com desnutrição energético - protéica grave

Autor	Nº Casos (idade)	Período Estudado	Músculo Estudado	Método de Coleta	Método de Análise	Coloração	Resultados
Montgomery 1962	6 (8 - 16 m)	Óbito por desnutrição grave	Sartório	Necropsia	Contagem do nº de núcleos e medida do diâmetro da fibra	HE	Redução diâmetro fibras, semelhante à idade fetal, perda de até 50% das fibras musculares e aumento colágeno.
Haliday 1967	2 (12 - 14 m)	Óbito por desnutrição grave	Todos	Necropsia	Análise da composição química		Redução K ⁺ muscular, aumento do conteúdo de água e redução da proteína.
Sachdev e col. 1971	30	Desnutrição grave (21) e recuperação (9)		EMG e VCN			EMG miopático em 10, fibrilação em 8 e normal em 4. VCN reduzida em 12.
Nassar e col. 1974	4 (4 - 24 m)	Desnutrição grave	Sartório e reto femoral	Biópsia a céu aberto	Ultraestrutura	Glutaraldeído + tetróxido de ósmio	Alteração de todos elementos estruturais do músculo, mais afetados os elementos contráteis.
Hansen-Smith e col. 1978	8 (16 ± 5 m)	Desnutrição grave e após recuperação nutricional	Quadríceps femoral	Biópsia percutânea por agulha	Contagem nº de núcleos	Glutaraldeído + tetróxido de ósmio	2/3 nº total de núcleos são de fibras musculares. Durante a fase de recuperação ocorre aumento do nº de células miogênicas (20%) em relação ao encontrado na fase de desnutrição (2,6%).
Reeds e col. 1978	7 (8 - 27 m)	Desnutrição grave e após recuperação nutricional		Biopsia a céu aberto	Excreção N ¹⁵ creatinina		Aumento da massa muscular proporcionalmente maior que o ganho de peso corporal, obtida por hipertrofia e hiperplasia.
Hansen-Smith e col. 1979	25	Durante e após a recuperação da desnutrição grave	Vasto lateral	Biopsia percutânea por agulha	Medida do diâmetro longitudinal fibra muscular	Glutaraldeído + tetróxido de ósmio	Na fase inicial de recuperação as fibras dobram de tamanho, posteriormente o ganho é mais lento. Ao final da recuperação as fibras atingem apenas 60% do tamanho das fibras de crianças nutridas de 6 m de idade.
Dastur e col. 1982	52 (5 m - 10 a)	Desnutrição grave	Quadríceps	Biopsia a céu aberto	Microscopia ótica com medida do diâmetro fibras	HE	Normal em 6 casos, atrofia difusa em 37 e agrupada em 5, padrão miopático em 4. Histoquímica em 5 casos, com falta de diferenciação de fibras em 3 (todos < 3 a).

a – anos; m = meses; EMG = eletromiografia; VCN = velocidade de condução nervosa; N = nitrogênio; HE = hematoxilina eosina; K = potássio

1.4.3 Alterações Musculares em Ratos Desnutridos

Os principais estudos de DEP em ratos, com avaliação histoquímica e morfológica do músculo e análise quantitativa das fibras musculares foram realizados durante o período de gestação e aleitamento, seguidos ou não por períodos de recuperação nutricional (Tabela 1.2).

Haltia e colaboradores desnutriram ratos machos no período de gestação e aleitamento, através da redução de até 50% da quantidade normal de ração, observando redução no diâmetro de todos os tipos de fibras musculares, que atinge seu ponto máximo (50% do valor do grupo controle) aos 180 dias de vida, não sendo totalmente restituída pela recuperação nutricional [Haltia e col. 1978].

Howell e colaboradores estudaram ratos machos desnutridos durante a gestação e aleitamento e recuperados até 36^a semana de vida, constatando redução do peso do músculo de contração rápida - tibial anterior (TA) de 25% e do músculo de contração lenta - sóleo (SOL) de 13%. Ocorreu uma redução de 20% na área média da fibra muscular do TA ($p < 0,001$), sem diferenças significativas na do sóleo. Utilizando as reações histoquímicas da SDH e a ATPase para diferenciação dos tipos de fibra muscular, notaram que no SOL o aumento da área das fibras ocorria apenas nas fibras do tipo 2a. No TA a redução do percentual de distribuição do tipo 1 e tipo 2a e na área das fibras tipo 1 era compensado por um aumento no percentual de fibras 2b [Howell e col. 1978].

Howells e colaboradores desnutriram ratos machos e fêmeas durante a gestação e o aleitamento, mantidos após desmame em dieta normal. Com 20 semanas de vida, apenas nos ratos machos apresentaram redução significativa do peso corporal e da massa dos músculos extensor longo dos dedos (ELD) e SOL. A redução na área da seção transversa da fibra foi verificada no ELD (músculo de contração rápida) em ambos os sexos. No SOL ocorreu hipertrofia das fibras, significativa apenas nos machos. Não observou alterações nas proporções dos tipos de fibras, nas reações de SDH e ATPase. Conclui que as respostas musculares à DEP são diferentes em ratos machos e fêmeas [Howell e col. 1979].

Hegarty e Kim compararam ratos machos jovens de 25 dias, desnutridos agudamente pela retirada total da alimentação até redução de 40% do peso corporal (3

dias após), com um grupo similar que foi realimentado até atingir o peso original. Não constatarem nenhum déficit permanente no número ou no diâmetro das fibras musculares [Hegarty e Kim 1980].

Bedy e colaboradores verificaram nos ratos desnutridos durante a gestação e por 27 dias de aleitamento e nos desnutridos do 30^o ao 60^o dia de vida, que as alterações musculares (redução de peso e da área da fibra) ocasionadas pela DEP do 30^o ao 60^o dia podem ser recuperadas com a normalização do estado nutricional. As alterações provocadas pela DEP ocorridas antes do 27^o dia de vida podem causar déficit permanente [Bedy e col. 1982].

Cavaliere e colaboradores avaliaram o crescimento e a diferenciação das fibras do músculo gastrocnêmico coradas pela reação histoquímica da NADH - Tetrazolium Redutase (NADH – TR) dos ratos submetidos à desnutrição protéica no período pré e pós-natal. Após o 8^o dia de vida ocorreu uma redução na área das fibras. No 28^o dia de vida as fibras apresentavam um retardo de duas semanas no crescimento e diferenciação, sendo o peso corporal $\frac{1}{4}$ do peso dos ratos controle de igual idade. Os ratos que foram reabilitados nutricionalmente apresentavam no 50^o dia de vida um peso corporal e uma diferenciação de fibras semelhante aos ratos controle com 28 dias de vida. Este retardo poderia ser conseqüente a um retardo na maturação das células nervosas [Cavaliere e col. 1986].

Nascimento e colaboradores, realizando um estudo histoquímico do músculo gastrocnêmio de ratos desnutridos durante a gestação e período de aleitamento, observaram uma redução no diâmetro das fibras, principalmente do tipo 2, sem alterações específicas na ME, denotando um retardo na maturação. Conclui que a desnutrição protéica pode provocar um retardo no desenvolvimento e hipoplasia da unidade motora [Nascimento e col. 1990]

Yamaguchi e colaboradores estudaram o peso e a área dos tipos de fibra corados pela reação histoquímica da ATPase nos músculos SOL e ELD de ratos machos desnutridos da 3^a até a 11^a semana de vida. Constataram que o aumento do peso e da área das fibras musculares estão muito mais relacionados ao aumento do peso corporal e à idade, do que ao grau de desnutrição do rato [Yamaguchi e col. 1992].

Brozanski e colaboradores utilizaram métodos eletroforéticos e imunohistoquímicos nos músculos de ratos desnutridos durante a gestação e o aleitamento até 60^o dia de vida, observando uma persistência anormal e significativa das cadeias pe-

sadas de miosina neonatal no diafragma dos ratos desnutridos até o 30º dia, quando nos ratos controles elas desapareceram no 21º dia de vida. Esta alteração do padrão normal de expressão das miosinas deve significar um retardo na maturação, ocasionado pela própria desnutrição ou pelo hipotireoidismo que pode ocorrer nestas situações [Brozanski e col. 1991].

Oliveira e colaboradores realizaram estudo histoquímico do músculo bíceps braquial de ratos recém nascidos submetidos à desnutrição durante a gestação e aleitamento, sendo parte do grupo desnutrido submetido à recuperação nutricional após o nascimento. O grupo desnutrido apresentou um baixo peso ao nascimento e fibras musculares com perda do predomínio de fibras tipo 2, diminuição do diâmetro, baixa atividade oxidativa, proliferação do tecido intersticial e edema. Interessante neste estudo é que os filhos dos ratos desnutridos que foram submetidos à recuperação nutricional (2ª geração) apresentavam um peso normal ao nascimento, com praticamente as mesmas alterações musculares encontradas ao nascimento nos ratos do grupo desnutrido, sugerindo que as alterações musculares induzidas pela desnutrição durante a gestação poderiam ser transmitidas para a geração seguinte [Oliveira e col. 1999].

Nestes estudos (Tabela 1.2) observa-se a presença de alterações significativas e persistentes na DEP ocorrida em ratos no período de gestação - aleitamento e após o desmame, não existindo dados que especifiquem em qual destas fases o músculo é mais susceptível a lesão pela DEP e quais seriam as alterações musculares provocadas pela DEP ocorrida exclusivamente durante o aleitamento.

Yamaguchi e colaboradores constataram que o peso, a área e a proporção das fibras nos músculos sóleo e extensor longo dos dedos de ratos submetidos à restrição alimentar até a 11ª semana de vida são fortemente influenciados pelo grau de aumento do peso corporal e pela idade e não pela presença ou não de desnutrição, sendo que o aumento relacionado a idade correlaciona-se diretamente com o aumento de peso concomitante [Yamaguchi e col. 1993].

Um estudo da DEP exclusivamente no período pós natal precoce foi realizado por Ward e Stickland em porcos da índia, que foram desnutridos durante todo o período de aleitamento até a 6ª semana de vida. Os músculos sóleo e bíceps braquial foram estudados por análise histoquímica com ATPase pH 4,6 e 10,6, SDH e miofosforilase. Ao final do período de estudo, o grupo desnutrido apresentava uma redução de 35% do peso corporal em relação ao grupo Controle. A área média das fi-

bras musculares era significativamente reduzida em todos os tipos de fibras do grupo Desnutrido (de 46% a 27%), sendo o bíceps braquial mais afetado que o sóleo. A proporção entre os vários tipos de fibras não foi alterada. Atribui este fato a um retardo na maturação das fibras musculares, significando que as fibras menores do grupo Desnutrido seriam mais imaturas. O bíceps braquial seria mais afetado por apresentar um crescimento mais rápido neste período que o sóleo [Ward e Stickland 1993]. Não existem estudos semelhantes em ratos, que apresentam um padrão evolutivo pré e pós natal diferente do porco da Índia [Dobbing 1974].

Concluindo, as alterações nos músculos de ratos e humanos devido a DEP já foram abordados de várias maneiras, mas as alterações encontradas nos músculos de ratos desnutridos exclusivamente durante o período de aleitamento ainda não foram adequadamente investigadas por métodos histoquímicos quantitativos e qualitativos.

1.5 Estudo Histoquímico do Músculo

Muitas das reações patológicas do músculo podem ser identificadas nas seções em parafina das biopsias musculares fixadas em formalina. Existem todavia numerosas alterações, que só poderão ser bem definidas ou até mesmo detectadas, nas seções musculares quando estas são cortadas em criostato e processadas a fresco por métodos histoquímicos. Este é um método imprescindível na investigação das alterações neuromusculares [Loughlin 1993].

Os músculos esqueléticos são constituídos por uma população heterogênea de fibras com propriedades variáveis de resistência à fadiga e velocidade de contração, de forma a poderem ajustar-se eficazmente as demandas permanentes e variadas de força, resistência e velocidade na contração [Kelly e Rubinstein 1994]. Este estado funcional do músculo é dinâmico e dependente da inervação, podendo alterar-se com a idade ou o treinamento [Bradley e Fell 1992].

Tabela 1.2 - Alterações por histoquímica muscular em ratos com desnutrição energético - protéica

Autor	Animal de Experimentação	Músculo Estudado *	Período de Desnutrição	Resultados
Haltia e col. 1978	Ratos Spraguey-Dawley machos	ELD	Desnutrição crônica durante a gestação e o aleitamento com recuperação até 180 dias.	Redução na área da seção transversa de todos os tipos de fibra muscular, atingindo $\pm 50\%$ aos 180 dias. Retardo da diferenciação histoquímica ao nascimento com normalização posterior.
Howells e col. 1978	Ratos Wistar machos	TA e SOL	Desnutrição crônica durante a gestação e o aleitamento com recuperação até 36 semanas.	Sóleo (contração lenta) inalterado. TA (contração rápida) com redução de 25% da massa muscular e de 20% da área fibra. Aumento da frequência de fibras 2b, com atrofia seletiva fibras tipo 1 e 2b.
Howells e col. 1979	Ratos Hooded machos e fêmeas	EDL e SOL	Desnutrição crônica durante a gestação e o aleitamento com recuperação até 20 semanas.	Proporção do tipo de fibras mantida em ambos sexos. Machos -- ELD com redução da área fibras 1 e 2b e do peso muscular. Sóleo com hipertrofia. Fêmeas - ELD com redução da área em todos os tipos de fibra.
Bedy e col. 1982	Ratos Hooded Lister	EDL e SOL	1º Grupo - durante a gestação e o aleitamento até 27º dia, com recuperação até 180 dias. 2º Grupo - do 30º ao 60º dia, com recuperação até 7 meses.	Desnutrido do 1º grupo apresentou redução do nº e diâmetro das fibras, não recuperado totalmente. Desnutrido do 2º grupo (após o desmame) sem alteração.
Cavaliere e col. 1986	Ratos Wistar machos e fêmeas	GAS	Desnutrição crônica durante a gestação e o aleitamento, com recuperação pré e pós-natal	Retardo no crescimento e na diferenciação dos tipos de fibras. Após a recuperação completou-se a diferenciação
Nascimento e col. 1990	Ratos Wistar machos e fêmeas	GAS	Desnutrição hipoproteica durante gestação e até o 30º dia	Redução diâmetro fibras, mais evidente tipo 2 → retardo maturação. Ausência de alterações ultra-estruturais nas fibras musculares.
Oliveira e col. 1999	Ratos Wistar machos e fêmeas	BB	Desnutrição crônica durante gestação e recuperação até 90º dia	Perda do predomínio de fibras tipo 2, redução diâmetro, baixa atividade oxidativa, proliferação do tecido intersticial e edema.

* Músculo Estudado – ELD (extensor longo dos dedos); TA (tibial anterior); SOL (sóleo); GAS (gastrocnêmio) e BB (bíceps braquial)

O estudo das enzimas responsáveis pelo comportamento metabólico das fibras musculares através de métodos histoquímicos permitiu a identificação de inúmeras características normais e patológicas das fibras musculares, tais como o padrão metabólico e de contração. O princípio básico é a reação de um substrato com uma enzima presente na seção muscular, seguida pela coloração do resultado desta reação, permitindo então a visualização da enzima.

1.5.1 Análise Histoquímica das Fibras Musculares

A análise do músculo com métodos histoquímicos têm por objetivo demonstrar [Dubowitz 1985, Banker e Engel 1994]:

1. os tipos de fibras musculares através das várias reações enzimáticas, procurando determinar o padrão de distribuição das fibras e o envolvimento de um determinado tipo de fibra em certos processos patológicos.
2. o aumento de um substrato específico ou a ausência de uma enzima em particular.
3. as várias alterações estruturais na fibra muscular que não são aparentes nas colorações histológicas rotineiras.

As principais reações histoquímicas e os processos metabólicos estudados estão sumarizados na Tabela 1.3:

Tabela 1.3 - Principais reações histoquímicas e colorimétricas

Processo Metabólico	Reação Histoquímica ou Coloração
Ciclo do Ácido Cítrico	Desidrogenase Succínica (SDH)
Transporte de Elétrons	Citrocromo C Oxidase
Utilização de Cetonas	Desidrogenase 3 Hidroxibutirato
Ciclo do Glicerofosfato	Desidrogenase Glicerol 3 Fosfato (ligado a menadiona)
Glicogenólise	Miofosforilase
Síntese de Glicogênio	Glicogênio Sintetase
Glicólise Anaeróbica	Desidrogenase Láctica
Contração Miofibrilar	Adenosina Trifosfatase (ATPase) Miofibrilar
Poupança de Nucleotídeos Purínicos	Adenilato Deaminase
Sinapses Neuromusculares	Colinesterase
Distribuição de Lisossomas	Fosfatase Ácida
Regeneração Muscular (RNA)	Pirinina Metil Green
Acúmulo de Glicogênio	PAS
Acúmulo de Lipídios	Óleo Vermelho Zero (<i>Oil Red O</i>) ou <i>Suddan Negro</i>

adaptado de [Johnson 1991]

3.1.2 Tipos de Fibras Musculares pela ATPase Miofibrilar

Os músculos esqueléticos dos mamíferos diferem-se primordialmente quanto à velocidade de contração, podendo ser lentos ou rápidos e quanto à coloração, podendo ser brancos ou vermelhos. A velocidade de contração está diretamente relacionada com a atividade da ATPase miofibrilar e com a presença de isoformas das proteínas contráteis miofibrilares e enzimas sequestradoras de Ca^{++} do retículo sarcoplasmático. A coloração está relacionada à concentração de mioglobulina oxidada, as altas concentrações de enzimas do metabolismo aeróbico e a vascularização do músculo [Kelly e Rubistein 1994].

Em 1960 Dubowitz e Pearse demonstraram que a atividade da fosforilase estava relacionada com a atividade de várias enzimas oxidativas nas fibras musculares, propondo a classificação das fibras musculares em 2 tipos. O tipo 1 possui alta atividade oxidativa e baixa glicolítica e o tipo 2 baixa atividade oxidativa e alta glicolítica. A utilização da análise histoquímica das fibras musculares sofreu um notável e essencial avanço, quando em 1969, Guth e Samaha iniciaram a utilização da reação

da ATPase miofibrilar, descrita por Padykula e Herman em 1955, para classificação dos tipos de fibras. O aperfeiçoamento desta reação foi efetuado por Brooke e Kaiser em 1969, que acrescentaram a pré-incubação das fibras em pHs variados, definindo a técnica que é amplamente utilizada para classificação das fibras musculares humanas [Brooke e Kaiser 1970, Dubowitz e Pearse 1960, Guth e Samaha 1969, Padikula e Herman 1955].

A enzima adenosina trifosfatase (ATPase), presente nas miofibrilas, apresenta um comportamento histoquímico variável e dependente do grau de inibição provocado pelos diferentes pHs dos meios de incubação onde se processa a reação. Este comportamento permite diferenciar as fibras musculares em vários tipos, conforme a atividade da ATPase nos vários pHs do meio de incubação, guardando relação com as características funcionais e metabólicas destas fibras [Brooke e Kaiser 1970].

As fibras do tipo 1 efetuam uma contração lenta e sustentada, com grande resistência à fadiga, necessitando de um suplemento estável e ininterrupto de energia fornecida pela ATPase miofibrilar, sendo o seu metabolismo predominantemente oxidativo. As fibras do tipo 2a são responsáveis pela contração rápida, breve e intensa, necessitando de uma grande capacidade glicolítica e glicogenólica. As fibras do tipo 2b apresentam uma atividade intermediária, com uma baixa capacidade glicolítica e uma grande capacidade oxidativa. As fibras do tipo 2c são consideradas um tipo de fibra não diferenciado ou fetal, ocorrendo em regeneração ou degeneração [Brooke e Kaiser 1970, Johnson 1991].

Quando a reação ATPase miofibrilar é realizada em meio alcalino com pH 9.4, as fibras musculares do tipo histoquímico 1 apresentam menor reação (maior inibição), corando menos que as do tipo 2. Se previamente as fibras forem pré-incubadas em pH 4.6, as fibras do tipo 1, 2b e 2c possuem maior atividade da ATPase (menor inibição) e coram mais que as do tipo 2a. Se pré-incubadas em pH 4.3, as fibras do tipo 1 mantém a menor inibição - coram mais escuro, as do tipo 2c um grau intermediário de atividade e as do tipo 2a e 2b quase nenhuma atividade – coram mais claras [Brooke e Kaiser 1970].

A classificação das fibras musculares pela ATPase miofibrilar em diferentes pHs é o método de escolha para a análise das biopsias musculares humanas por ser muito confiável e correlacionar bem com vários estados patológicos [Dubowitz 1986, Loughlin 1993, Werneck 1991].

As fibras musculares de uma mesma unidade motora possuem sempre o mesmo tipo de fibra à ATPase miofibrilar incubada em um determinado pH, pois a diferenciação dos tipos e do metabolismo da fibra é dependente do tipo de inervação que a fibra recebe. Estas fibras não estão aglomeradas e sim dispersas aleatoriamente entre fibras de várias outras unidades motoras. No homem este padrão de distribuição é equilibrado e relativamente homogêneo nos vários músculos, assemelhando-se a um mosaico ou tabuleiro de xadrez [Banker e Engel 1994].

Nos animais existe uma enorme variação de tipos de fibras musculares, com cada tipo de músculo especializado para determinada função, tendo um acentuado, e por vezes absoluto, predomínio de um determinado tipo de fibra, com características metabólicas próprias para aquela especialização muscular.

No homem ocorre um grau limitado de especialização muscular, que é obtido pela variação da proporção de cada tipo de fibra no músculo, existindo basicamente apenas 3 tipos de fibras musculares (Tabela 1.4). As fibras do tipo 2c não são consideradas um tipo específico de fibra e sim uma fibra imatura que deverá posteriormente diferenciar-se nos outros 3 tipos.

Tabela 1.4 - Tipos de fibras musculares no homem
Perfil da ATPase miofibrilar, atividade oxidativa mitocondrial (SDH e NADH)
e atividade glicolítica (miofosforilase) em fibras musculares humanas.

Tipos de Fibras Musculares					
Enzima	Pré-incubação	1	2a	2b	“2c”
ATPase	pH 10.2	+	++	+++	+
	pH 4.6	+++	+	++	++
	pH 4.3	+++			+ / ++
Miofosforilase		+	++	+++	+
SDH		+++	++	+	++ / +
NADH		+++	++	+	++

ATPase (adenosina trifosfatase miofibrilar); SDH (desidrogenase succínica), NADH (NADH-tetrazolium reductase).

As cruzes indicam a intensidade da coloração. (adaptado de Johnson 1991)

Os principais tipos de classificação de fibras musculares utilizam as características metabólicas ou da ATPase e identificam os 3 tipos principais de fibras musculares. Uma classificação utilizando os tipos de isoformas das cadeias pesadas da miosina, correlaciona-se bem com o tipo de atividade contrátil da fibra e permite identificar mais de 10 tipos de fibras em animais e no homem [Kelly e Rubstein 1994, Staron e col. 2000].

A classificação utilizando a ATPase miofibrilar, com pré-incubação em pHs variados, proposta por Brooke e Engel é a mais utilizada para o músculo humano e uma das mais utilizadas no estudo do músculo de outros mamíferos [Brooke e Engel 1969].

3.1.3 Diferenciação dos Tipos de Fibras Musculares no Homem

No homem as fibras musculares surgem entre a 8^a e a 10^a semana de gestação, e são denominadas fibras “Wohlfart B”, sendo capazes de expressar apenas isoformas de miosinas de cadeia pesada com contração lenta. Esta etapa ocorre sem a presença de inervação. A diferenciação dos tipos de fibras inicia-se gradativamente a partir da 22^a semana de vida fetal, após o padrão de inervação já estar estabelecido.

Inicialmente existem apenas fibras semelhantes ao tipo 2c. Somente após a 30^a semana de vida fetal é possível diferenciar os três tipos de fibras e identificar o

padrão em mosaico característico, quando as fibras já são capazes de expressar isoformas de miosinas de cadeia pesada com contração rápida.

Da 30^a a 40^a semana surgem fibras semelhantes às fibras do tipo 1, porém de maior tamanho, que são denominadas fibras “Wohlfart A”, compreendendo de 5 a 10% de todas as fibras nesta fase, que irão desaparecer até a 40^a semana. Também após a 30^a semana inicia-se a diferenciação das fibras 2c em 2a.

O processo de diferenciação e transformação dos vários tipos de fibras é totalmente dependente da presença de inervação e já ao nascimento observa-se uma proporção dos vários tipos de fibras similar à do adulto, exceto que o recém nato têm até 20% de fibras indiferenciadas (2c) enquanto o adulto apenas 1-2%.

O número total de fibras do tipo 2 é mantido relativamente constante desde o nascimento, variando posteriormente apenas a percentagem de cada tipo de fibra, particularmente pelo aumento das fibras tipo 2b, que ao nascimento é de apenas 2%. Do 1^o ao 5^o ano de vida ocorre uma redução do percentual de fibras tipo 2a, com um aumento proporcional da percentagem de fibras tipo 2b, aparentemente pela transformação de fibras 2a em 2b [Carpenter e Karpatti 2002, Elder e Kakulas 1994, Kelly e Rubinstein 1994, Sarnat 1982].

Desde a sua formação os músculos crescem tanto em extensão quanto em circunferência. O crescimento muscular ocorre devido ao aumento no número de fibras, acréscimo de núcleos às fibras ou aumento no citoplasma [Stephen 1994].

Em idosos, Kirkeby e Garbasch observaram uma alteração no padrão da atividade da ATPase e das colorações anti-miosina e uma redução no diâmetro das fibras nos idosos em relação aos adultos jovens, quando estudaram o músculo vasto lateral e masseter de adultos jovens de 18 a 24 anos e idosos de 90 a 102 anos [Kirkeby e Garbasch 2000].

3.1.4 Diferenciação dos Tipos de Fibras Musculares no Rato

No rato a musculatura do membro posterior apresenta desde o nascimento uma diferenciação evidente das fibras tipo 1 e 2c, quando 90% das fibras são do tipo 2 e ocorre um predomínio de fibras do tipo 1 no músculo sóleo. Ao final da 1^a semana de vida, as fibras 2c permanecem inalteradas no sóleo. Nos outros músculos, as fibras 2c iniciam a diferenciação para fibras do tipo 2b, que irão corresponder a até

40% das fibras neste período. Na 3ª semana de vida, as fibras 2c restantes transformam-se em fibras tipo 2a, principalmente no sóleo. Ao final da 4ª semana de vida a diferenciação completa-se, surgindo um padrão de fibras 1, 2a e 2b semelhantes ao padrão adulto, exceto no sóleo, onde não ocorrem fibras do tipo 2b [Brooke e col. 1971, Curless e Nelson 1976, Haltia e col. 1978, Kugelberg 1976, Nelson 1976]. O padrão de unidade motora surge aos 16 - 18 dias de vida [Haltia e col. 1978].

Os neurônios motores influenciam significativamente diversos aspectos da morfologia e da função da fibra muscular, tais como a determinação da cinética e das vias metabólicas para contração da fibra e a localização e regulação das sinapses. Esta ação parece ser decorrente tanto da liberação de fatores tróficos quanto da atividade neuronal. O inervação precária ou retardada causa um comprometimento da diferenciação e do crescimento das fibras musculares [Glineel 1994].

A interação neurônio-músculo induz a transformação das isoenzimas musculares e a função contrátil da fibra muscular. As fibras tipo 1 contêm apenas miosina de contração lenta e as fibras tipo 2b apenas miosina de contração rápida. As de tipo 2a apresentam os dois tipos de miosina, com predomínio da rápida. Após ser inervado o tipo de miosina a ser sintetizado pelo músculo é determinado grandemente pelo tipo de estimulação causado pelo axônio e pode ser detectada no músculo fetal do rato já a partir do 17º dia de vida intrauterina [Rubstein e Kelly].

Não existe uma correlação apropriada entre as várias classificações de fibras musculares em ratos, utilizando as várias reações histoquímicas. Os principais sistemas de classificação de fibras musculares utilizam reações histoquímicas e baseiam-se na atividade da ATPase miofibrilar ou na atividade oxidativa. Outras classificações são baseadas nas propriedades fisiológicas da fibra (Tabela 1.5). Não existe uma correlação adequada entre os vários tipos de fibra de uma classificação com os de uma outra em um mesmo músculo [Sher e Cardasis 1976].

Tabela 1.5 - Perfis histoquímicos das fibras musculares de ratos

	Tipo da Fibra		
	1	2a	2b
Tamanho da Fibra	médio	pequeno	grande
Velocidade da Contração	lenta	rápida	rápida
Método Energético Preferencial	aeróbico oxidativo	oxidativo glicolítico	anaeróbico glicolítico
Intensidade da Coloração			
Enzimas Oxidativas (aeróbicas)	++	+++	+
Enzimas Glicolíticas (anaeróbicas)	++	+	+++
ATPase miofibrilar pH 9.4	+	+++	++
Equivalência entre as Classificações			
Romanul 1964	III	II	I
Stein e Padyukula 1964	B	C	A
Kugelberger e Edström 1968	C	B	A
Edgerton e Simpson 1969	intermediária	vermelha	branca
Yellin e Guth 1970	β	α	$\alpha\beta$
Brooke e Kaiser 1970	I	II a	II b
Barnard e col. 1971	rápida branca	lenta intermediária	rápida vermelha
Soukup e col. 1979	SO (oxidativa lenta)	FOG (oxidativa glicolítica rápida)	FG (glicolítica rápida)

As cruzes indicam a intensidade da coloração. (Adaptado de Close 1972, Holwells e col. 1978, Bradley e Fell 1982)

3.1.5 Análise Quantitativa do Tamanho e do Padrão de Distribuição das Fibras Musculares

As fibras musculares alteram o seu tamanho e a proporção entre os vários tipos de fibras de forma diferente, conforme a ação de vários fatores fisiológicos e patológicos, como por exemplo o exercício que causa aumento da fibra, a inatividade

que leva a uma redução da fibra ou a desinervação, que irá causar uma atrofia seletiva das fibras inervadas pelo axônio lesado [Brooke e col. 1971, Engel 1994, Loughlin 1993].

A identificação da presença destas alterações têm valor diagnóstico para várias doenças musculares, neuronais ou sistêmicas, mas nem sempre a avaliação visual realizada rotineiramente permite reconhecê-las. É necessário a quantificação destas anormalidades para podermos valorizá-las [Sandstedt e col. 1982].

As principais indicações da quantificação das observações da microscopia óptica ou eletrônica de músculo são [Brooke e Engel 1969, Engel 1994]:

1. confirmar impressões qualitativas pela quantificação dos achados (por exemplo o percentual de fibras atroficas).
2. detectar alterações sutis não observadas na análise qualitativa (por exemplo o predomínio de um determinado tipo de fibra).
3. correlacionar, explicar ou sugerir alterações funcionais pela quantificação das observações morfológicas.
4. permitir análise estatística dos achados e correlacioná-los com padrões de normalidade.

Existem vários métodos de aferição da área ou do diâmetro a fibra muscular, porém pelas razões acima citadas, estas medições nem sempre são precisas. A escolha do melhor método ou tipo de aferição dependerá do tipo e do tamanho dos elementos estudados e dos recursos disponíveis, podendo ser efetuada por métodos digitais ou manuais.

Edström e Torlegard compararam quatro métodos de medida da área (planimetria, grade, pontos e média de dois diâmetros ortogonais) da seção transversa da fibra muscular do bíceps braquial humano processado pela NADH. Considerou ser mais preciso, e também muito mais demorado, o método planimétrico. Os outros três métodos têm tempos de realização e precisão equivalentes, com o desvio padrão do método de grade o mais próximo do desvio padrão ideal. Propõe a utilização do método de grade pela precisão aceitável e rapidez da mensuração [Edström e Torlegard 1969].

Clancy e Herlily em 1969, em citação de Engel, também compararam três métodos de medida da área da seção transversa da fibra muscular. Notaram que

quando no cálculo da área é utilizado o menor diâmetro, a área é subestimada em 37% e quando utilizado o maior diâmetro é superestimado em 67%. Ao utilizar-se a média aritmética do maior e menor diâmetro ocorre uma melhora do resultado, com uma super-estimação de apenas 8%. Sugere ser o melhor método a utilização da média geométrica do maior e menor diâmetro, que irá superestimar a área da fibra em apenas 1% [Engel 1994].

Kost e Kost compararam a medida da fibra utilizando o menor diâmetro e do maior diâmetro ortogonal de fibras musculares de coelho, comparando com a área da seção transversa, obtido através da multiplicação dos diâmetros ortogonais. Conclui serem muito equivalentes os resultados obtidos com os dois métodos, mas a medida do menor diâmetro tende a subestimar em 16 a 21% o diâmetro da fibra [Kost e Kost 1982].

Venema e Overweg utilizando fibras musculares humanas processadas por métodos histoquímicos à fresco estudou 10 parâmetros de medida do tamanho e da forma das seções transversas e concluiu que todos eles apresentam imperfeições, principalmente pela obliquidade da seção de corte na fibra muscular. A medida da área seria o parâmetro isolado mais adequado para dimensionar uma fibra muscular [Venema e Overweg 1974].

A digitalização das imagens microscópicas permitiu uma maior precisão e facilidade na realização das medidas de área e diâmetros, podendo ser considerada hoje como a metodologia ideal para realizar a análise quantitativa das fibras musculares, particularmente pela maior rapidez na obtenção dos resultados.

Sandstedt comparou a medida da área de fibras musculares utilizando 3 métodos (grade, digitalização e desenho-digitalizado) e conclui que as medidas feitas com métodos manuais são tão acuradas quanto as feitas por métodos digitais [Sandstedt 1981]. Loughlin reafirma com esta conclusão, ressaltando que métodos manuais consomem muito mais tempo [Loughlin 1993].

Por definição, para efetuar a medida do diâmetro da fibra é necessário traçarmos duas linhas retas no sentido do maior e do menor comprimento da fibra, que se cruzam em angulo reto no centro da fibra [Song e col. 1963]. Desta maneira podemos determinar:

Menor diâmetro - menor distância em linha reta que se estende até as duas extremidades opostas, passando pelo centro da seção transversa da fibra.

Maior diâmetro – maior distância em linha reta que se estende até as duas extremidades opostas, passando pelo centro da seção transversa da fibra.

Área da seção transversa – área contida no interior de uma seção transversa de uma fibra, independente do seu formato.

Estimativa da área da seção transversa – área da seção transversa de uma fibra, obtida considerando-se a fibra um círculo cujo diâmetro é a média geométrica entre o menor e o maior diâmetro medido.

Coeficiente de variabilidade – desvio padrão do diâmetro da fibra x 1000, dividido pelo diâmetro médio de todas as fibras. Normalmente é inferior a 250 nos músculos humanos [Brooke e King Engel 1969].

Diversos fatores dificultada a aferição do tamanho da fibra [Engel 1994]:

1. as seções transversas da fibra são usualmente poligonais e irregulares e não circulares.
2. a área da seção transversa da fibra aumenta conforme reduz a extensão do sarcômero.
3. as fibras podem não apresentar uma orientação uniforme em uma seção do músculo.
4. fixação e desidratação reduzem o diâmetro das fibras.
5. congelamentos e descongelamentos repetidos ou artefatos de congelação aumentam o diâmetro das fibras.

A análise do tamanho da fibra permite identificar a presença de atrofia ou hipertrofia das fibras musculares. Estas alterações podem ocorrer apenas em uma determinada região do músculo ou em um determinado tipo de fibra, ou podem ser difusas e acometerem todos os tipos de fibras.

O método proposto por Brooke e Engel para analisar o tamanho das fibras humanas baseia-se na medida do menor diâmetro da fibra e na construção de um histograma de distribuição das fibras conforme o tipo e tamanho. Recomenda a medição de 100 a 200 fibras. Em condições normais as fibras de vários tamanhos distribuem-se em um histograma com o aspecto de uma curva normalizada ou em sino, que varia conforme a idade e o sexo. Eventualmente este histograma pode apresentar um desvio da curva para esquerda (nos casos de redução do tamanho) ou um desvio para a direita (nos caso de aumento do tamanho), no entanto o maior valor é a representação visual da distribuição das várias fibras por tipo e tamanho [Brooke e Engel 1969].

3.1.6 Evolução do Diâmetro das Fibras Musculares

No homem, o diâmetro médio das fibras musculares do feto com 20 semanas é de 6 a 7 μ , aumentando gradualmente até atingir 15 a 17 μ no 1º ano de vida. A partir daí ocorre um aumento de aproximadamente 2 μ por ano até a idade de cinco anos. Dos cinco aos nove anos, o diâmetro aumenta em torno de 3 μ , atingindo o tamanho do adulto (42 a 69 μ) entre os 12 e 15 anos. Após a 40ª semana de idade gestacional as fibras do músculo humano normal não apresentam uma variação no diâmetro médio superior a 12%, nem um coeficiente de variabilidade maior que 250 [Banker e Engel 1994, Brooke e Engel 1969, Dubowitz 1985].

No lactente e na criança, o diâmetro médio das fibras tipo 1 e 2 são semelhantes, com pequena variabilidade de tamanho. No homem adulto as fibras do tipo 2 são geralmente de maior diâmetro, ocorrendo o contrário na mulher. O diâmetro das fibras do tipo 1 varia muito pouco, com as fibras tipo 2 tendo maior variação [Banker e Engel 1994].

1.6 O Músculo Gastrocnêmio do Rato

O rato têm sido amplamente utilizado para estudos de DEP, mas os seus diversos músculos apresentam características bastante variadas, sendo necessário um melhor detalhamento do músculo a ser estudado.

O comprometimento da musculatura esquelética do rato na desnutrição não ocorre de forma homogênea, sendo a musculatura mais comprometida a do tronco, seguida pela do membro posterior. A menos comprometido é a do membro anterior [Spence e Hansen-Smith 1978].

A porção posterior da perna do rato apresenta dois grupos musculares. O grupo superficial é composto pelo músculo tríceps sural, formado pelos músculos gastrocnêmio e sóleo, que se originam independentemente e terminam em um único tendão, e pelo músculo plantar. O grupo profundo é composto pelos músculos poplíteo, flexor longo do halux, flexor longo dos dedos e tibial posterior [Greene 1959].

O músculo gastrocnêmico apresenta duas porções que surgem de pontos diferentes. A porção medial origina-se do epicôndilo medial do fêmur e da fabela medial. A porção lateral origina-se do epicôndilo lateral e na fabela lateral. Ao nível do terço médio da perna as duas porções se fundem e dão origem a um tendão comum. Este tendão, após unir-se ao tendão do músculo sóleo, passa a denominar-se tendão do calcâneo, vindo a inserir-se no tubérculo do calcâneo [Greene 1959].

Em animais a variação nas proporções dos vários tipos de fibras é a regra para um determinado músculo e até mesmo para uma determinada região de um músculo [Pullen 1977]. No sóleo predominam as fibras do tipo 1, no tibial anterior 2/3 das fibras são do tipo 2. Alguns músculos, como gastrocnêmio apresentam um predomínio de fibras tipo 2. Todavia na cabeça medial do gastrocnêmio ocorrem três tipos de fibras, distribuídas em um padrão de mosaico, semelhante ao encontrado no músculo humano [Banker e Engel 1994, Brooke e Kaiser 1970, Sher e Cardasis 1976].

Utilizando a reação da desidrogenase succínica (SDH) em uma seção transversa a cinco milímetros da origem do gastrocnêmio e a presença de um fuso muscular como marcador da localização da porção escura da cabeça mesial do gastrocnêmio, pode-se identificar na cabeça medial do músculo gastrocnêmio de ratos três tipos de fibras (A, B e C) e no sóleo dois tipos (B e C). O gastrocnêmio apresenta um padrão de distribuição não homogêneo, com predomínio de fibras brancas (A) na porção interna e fibras vermelhas (B e C) na porção superficial. O sóleo apresenta uma distribuição homogênea dos dois tipos de fibras [Stein e Padykula, 1962].

A reação da ATPase miofibrilar, com pré-incubação em pHs diferentes, no músculo gastrocnêmio do camundongo adulto evidencia a presença de 3 tipos de fi-

bras musculares (1, 2a e 2b), com um padrão de distribuição típico em 3 zonas (Figura 1.2). A zona externa compreende a maior parte do músculo, ocupando a periferia e a metade externa do mesmo. Apresenta uma coloração mais clara, sendo composta quase totalmente por fibras 2a (94%), com uma pequena fração de fibras tipo 2b (6%), gradualmente maior na proximidade da zona média. A zona média apresenta uma coloração intermediária, com 28% de fibras do tipo 2b e 3% do tipo 1 e predomínio das fibras do tipo 2a (69%). A zona interna situa-se na porção profunda do músculo, apresenta uma coloração mais escura e é dividida em duas partes, cada uma delas separada pela zona média. As fibras apresentam um padrão de distribuição em mosaico, com 25% de fibras tipo 1 e 15% do tipo 2a, e predomínio das fibras 2b (61%). É também a única região do músculo com fusos musculares [Sher e Cardasis, 1976].

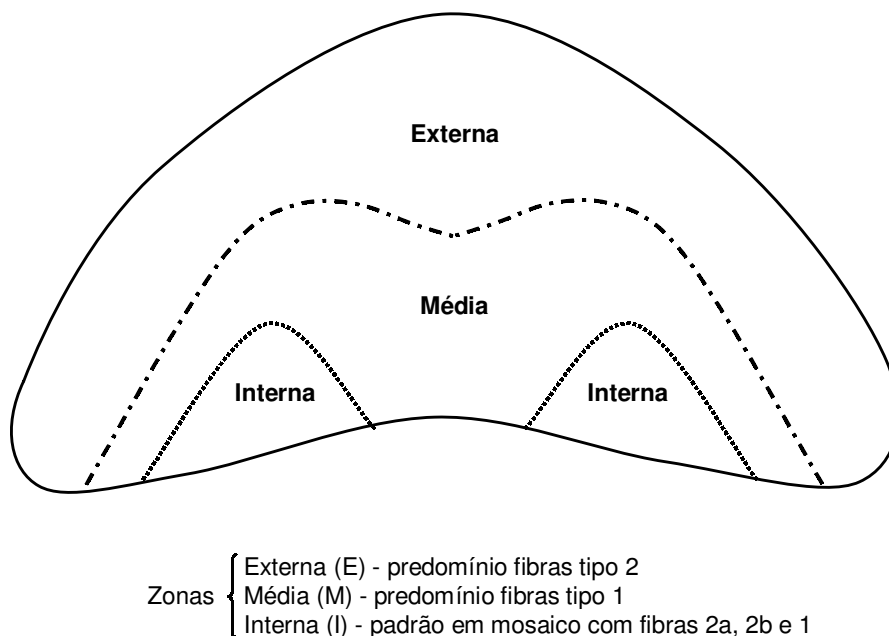
Song e colaboradores estudando os diâmetros das fibras musculares do gastrocnêmio de ratos, encontrou os seguintes valores [Song e col. 1963]:

Maior diâmetro – $38,6 \pm 0,89 \mu$

Menor diâmetro – $28,3 \pm 0,60 \mu$

Relação entre maior e menor diâmetro – 1.36

Os tipos de fibras do músculo gastrocnêmio do rato são equivalentes aos tipos de fibra encontrados no músculo gastrocnêmio humano, permitindo a extrapolação dos achados em ratos para o homem [Brooke e Kaiser 1970 e Brooke e col. 1971].



** Adaptado de Sher e Cardasis 1976*

**Figura 1.2 – Zonas do Músculo Gastrocnêmio do Rato
Seção Transversa - ATPase 4.3**

Conforme observado nos dados apresentados anteriormente, o estudo do músculo gastrocnêmio de ratos submetidos à DEP exclusivamente durante o período de aleitamento, utilizando métodos histoquímicos e colorimétricos e análise quantitativa e morfométrica das fibras musculares, poderá elucidar as repercussões musculares da DEP durante este período de rápido crescimento. Por não ser encontrado na literatura nenhum estudo com estas características, realizado neste período do desenvolvimento, justifica-se a realização desta pesquisa.

Objetivos

1. Identificar as possíveis alterações ocorridas no músculo gastrocnêmio de ratos desnutridos exclusivamente durante o período de aleitamento.
2. Comparar as possíveis alterações qualitativas e quantitativas encontradas no músculo gastrocnêmio de ratos desnutridos e eutróficos.

Material e Métodos

3.1 Animal de Experimentação

O animal escolhido para experimentação foi o "Rattus Norvegicus", da cepa WISTAR, da linhagem do Biotério do Laboratório Experimental de Pediatria do Departamento de Pediatria da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP (São Paulo - SP). Este animal é de fácil obtenção e manuseio, com baixo custo de manutenção. Por ser muito utilizado em pesquisa científica, o tamanho e o tipo das fibras musculares nos seus vários músculos são amplamente conhecidos [Ariano e col. 1973, Brooke e col. 1971, Brooke e Kaiser 1970, Sher e Cardasis 1976, Stein e Padykula 1962].

3.1.1 Manejo do Animal de Experimentação

A - Alojamento - realizado em gaiolas apropriadas, diariamente higienizadas com troca da água dos bebedouros e da cama de cepilho de madeira. O ambiente era mantido com temperatura estável a 28º C, sob iluminação artificial por períodos de 18 horas, no Laboratório Experimental de Pediatria do Departamento de Pediatria da UNIFESP.

B - Alimentação - feita com ração especial para animais de laboratório da Cooperativa Agrícola Batavo Ltda. (Castrolândia, Paraná), sendo permitida a ingestão de água e de ração "*ad libitum*" para as ratas durante o período de crescimento, gestação e aleitamento, através de comedouros colocados na grade superior das gaiolas e inacessíveis aos ratos filhotes. Desta forma evita-se a desnutrição da rata-nutriz, preservando a qualidade de seu leite para a nutrição dos ratos filhotes.

3.1.2 Obtenção do Animal de Experimentação

A – Gestação - nove ratas adultas, virgens e eutróficas, pesando em média $216,97 \pm 18,47$ gramas, foram acasaladas aos 90 dias de vida. A comprovação da fecundação foi obtida através da presença de espermatozóides no esfregaço da secreção vaginal, considerando-se este o dia ZERO de gestação. Eram denominadas ratas mãe.

Durante o período de gestação as ratas mães permaneciam nas condições descritas nos itens anteriores, sendo pesadas no dia da fecundação e no 4º, 7º, 10º, 14º, 18º e 21º dia de gestação.

B - Ganho de Peso das Ratas-Mãe durante a Gestação - no dia da fecundação o peso médio das ratas-mãe era $216,97 \pm 6,53$, variando de 193,3 a 249,9 g (Tabela 3.1). Durante o período gestacional ocorreu um aumento médio do peso corporal de 45,9%, sendo de 9,3% na 1ª semana de gestação, 9,6% na 2ª semana e de 21,6% na 3ª semana. A rata H, a de maior peso inicial (249,9 g), obteve um ganho de peso de 43,7%. A rata E, a de menor peso inicial (193,3 g), obteve um ganho de peso de 49,8%. A rata G, cujo peso inicial era de 206,1 g, obteve o maior percentual de ganho de peso (57,8%). Ao final da gestação o peso médio das ratas-mãe era de $316,10 \pm 8,04$, variando de 287,0 a 359,1 (Tabela 3.1 e Figura 3.1).

Tabela 3.1 - Ganho de peso das ratas-mãe

Rata Mãe	Dias de Gestação (peso em gramas)							% Ganho Peso na Gestação
	0	4	7	10	14	18	21	
A	242,0	253,0	259,0	261,8	281,3	318,5	342,5	41,53
B	226,6	238,2	247,8	259,3	268,3	290,8	323,4	42,72
C	207,6	225,8	235,9	246,3	256,3	277,6	301,4	45,18
D	208,6	221,7	225,6	239,3	248,5	275,4	302,0	44,77
E	193,3	211,2	215,2	223,0	245,0	267,1	289,5	49,77
F	221,8	233,0	235,7	246,3	257,3	285,4	314,8	41,93
G	206,1	223,2	234,9	241,4	262,2	291,5	325,2	57,79
H	249,9	261,1	267,5	273,3	287,0	312,0	359,1	43,70
I	196,8	203,6	213,0	216,8	232,9	262,5	287,0	45,83
Média	216,97	230,09	237,18	245,28	259,87	286,76	316,10	45,91
DP	6,53	6,19	6,15	6,03	5,74	6,32	8,04	1,70
Ganho Semanal Peso (%)			9,32		9,57		21,64	

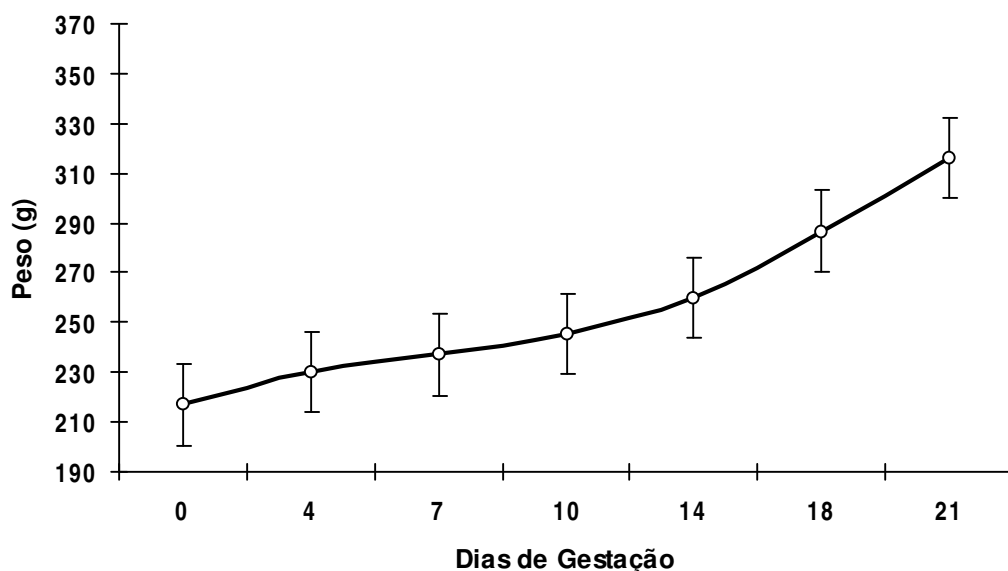


Figura 3.1 - Ganho de Peso das Ratas-Mãe (média e intervalo de confiança 95%)

C - Desnutrição no Período de Aleitamento - ao nascimento os filhotes fêmeas eram sacrificados e os filhotes machos, tatuados nos pés para identificação. Nas primeiras 24 horas de vida eram distribuídos aleatoriamente, em grupos de 6 filhotes por rata nutriz no grupo Controle e de 12 filhotes por rata nutriz no grupo Desnutrido. Os ratos do grupo Desnutrido eram mantidos em jejum (separados da rata nutriz) por 6 horas diárias, sendo os ratos do grupo Controle mantidos permanentemente com a rata nutriz até o momento do abate no 24º dia de vida. A DEP nos ratos do grupo Desnutrido foi provocada pelo período de jejum e pelo aumento do número de filhotes por rata nutriz, durante o período de aleitamento. Apesar de não ser objetivo do estudo, não foi observada modificações evidentes no padrão comportamental dos ratos desnutridos em relação aos ratos controle.

Os ratos de ambos os grupos eram pesados ao nascimento e às 12:00 horas do 1º, 7º, 14º, 22º, 23º e 24º dia de vida.

D - Ganho de Peso dos Ratos-Filhotes

Grupo Controle - o peso médio dos ratos-filhote do grupo Controle ao nascimento era de $5,70 \pm 0,38$ g (intervalo de confiança 95% de 5,49 a 5,92), variando de 5,14 a 6,81 g. Ao 24^o dia o peso médio era $47,05 \pm 2,48$ g (intervalo de confiança 95% de 45,68 a 48,43), variando de 43,4 a 51,3 g (Tabela 3.2). Para este grupo ocorreu um ganho de peso na 1^a semana de 137,8%, na 2^a semana de 74,7%, na 3^a semana de 37,3% e nos últimos três dias (22^o, 23^o e 24^o) de 21,4% (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Ganho de peso dos ratos - grupo Controle

Rato	Dias de Vida - Peso em gramas							
	0	1	7	14	21	22	23	24
C1	5,14	5,96	16,6	27,8	37,0	42,7	46,4	49,8
C2	5,27	6,26	16,9	28,7	38,4	41,0	43,7	47,0
C3	5,44	6,33	17,2	28,1	39,2	40,3	43,8	46,5
C4	5,71	6,85	17,5	32,1	40,9	44,4	47,5	49,3
C5	5,53	6,96	17,3	30,8	39,8	42,3	44,7	46,9
C6	5,66	6,72	17,4	32,4	42,7	46,1	48,7	51,3
C7	5,78	7,00	16,1	30,3	41,5	43,7	47,5	48,7
C8	5,64	6,83	15,5	28,0	41,7	44,3	46,6	50,3
C9	5,94	7,02	15,1	25,7	38,6	40,3	42,4	45,3
C10	5,62	6,71	14,6	27,1	38,4	38,9	41,2	44,7
C11	5,43	6,59	13,6	29,1	37,2	39,0	40,0	43,9
C12	5,97	7,04	16,5	26,2	39,1	40,2	42,9	46,1
C13	5,74	6,83	15,4	28,5	39,8	42,5	45,1	48,3
C14	5,88	6,91	15,8	24,2	33,5	35,8	37,9	43,4
C15	6,81	7,88	16,8	24,4	33,7	37,2	38,8	44,3
Média	5,70	6,79	16,15	28,23	38,77	41,25	43,81	47,05
DP	0,39	0,43	1,14	2,50	2,64	2,84	3,30	2,48
Ganho Médio Peso (%)		19,1	137,8	74,7	37,3	6,4	6,2	7,4

Grupo Desnutrido - O peso médio dos ratos-filhote do grupo Desnutrido ao nascimento era de $5,35 \pm 0,39$ g (intervalo de confiança 95,0% de 5,14 a 5,57), variando de 4,76 a 6,13 g. Ao 24º dia o peso médio era $31,51 \pm 2,98$ g (intervalo de confiança 95,0% de 29,86 a 33,16), variando de 26,7 a 36,7 g (Tabela 0-3). Para este grupo ocorreu um ganho de peso na 1ª semana de 61,8%, na 2ª semana de 98,2%, na 3ª semana de 37,3% e nos últimos três dias (22º, 23º e 24º) de 33,8% (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 - Ganho de peso dos ratos - grupo Desnutrido

Rato	Dias de Vida - Peso em gramas							
	0	1	7	14	21	22	23	24
D1	5,70	6,33	9,3	18,4	26,7	30,0	33,3	34,9
D2	5,81	6,52	9,2	19,1	24,2	28,5	32,5	33,8
D3	5,76	6,36	9,6	18,9	26,1	29,8	33,4	35,6
D4	6,13	6,95	9,8	18,7	25,9	30,8	35,4	36,7
D5	5,54	6,23	8,7	18,3	24,2	26,5	29,8	30,5
D6	5,32	6,08	7,1	16,2	22,2	23,9	27,6	29,9
D7	4,94	5,38	6,8	14,9	19,8	23,2	25,3	26,7
D8	5,44	5,88	8,0	17,6	23,5	26,7	30,4	32,6
D9	5,43	5,81	7,7	17,5	21,7	24,8	27,9	29,3
D10	5,15	5,70	8,2	17,1	22,2	26,3	27,8	30,5
D11	5,14	5,62	9,1	16,5	24,6	27,5	30,0	32,0
D12	4,81	5,30	8,7	16,7	23,5	27,1	28,6	30,8
D13	5,23	5,88	9,2	17,2	25,1	28,6	30,2	33,1
D14	5,11	5,57	9,4	14,8	20,0	22,5	22,9	26,7
D15	4,76	5,19	9,1	15,5	23,6	26,0	27,8	29,6
Média	5,35	5,92	8,66	17,16	23,55	26,81	29,53	31,51
DP	0,39	0,41	0,91	1,40	2,07	2,49	3,26	2,98
Ganho Médio Peso (%)		10,6	46,3	98,1	37,3	13,8	10,1	6,7

Comparação entre os Grupos Controle e Desnutrido – o peso médio de todos os ratos filhotes (grupos Controle e Desnutrido) ao nascimento era $5,53 \pm 0,42$ g (intervalo de confiança 95% de 5,37 a 5,69), variando de 4,76 g (rato D15 - grupo Desnutrido) a 6,81 g (rato C15 - grupo Controle).

Os ratos filhote do grupo Controle apresentaram desde o nascimento um peso médio maior ($p = 0,0094$) que os do grupo Desnutrido (Tabela 3.4).

O diferencial do peso médio dos 2 grupos, que era de 6,6% no dia do nascimento, atingiu seu ponto máximo (46,4%) no 7º dia de vida e foi de 33,0% ao término do período de experimentação (24º da).

O ponto máximo do percentual de ganho de peso nos ratos do grupo Controle foi de 137,8%, ocorrendo na 1ª semana, sendo de 98,1% nos ratos do grupo Desnutrido e ocorrendo na 2ª semana de vida.

A distribuição dos ratos filhotes machos entre os dois grupos foi feita de forma aleatória, conforme o dia do parto das ratas mães, evitando que irmãos permanecessem no mesmo grupo de estudo. Apesar destes cuidados, o peso corporal médio dos ratos do grupo Desnutrido era 6,19% ($p < 0,001$) inferior aos do grupo Controle no dia 0, correspondente ao dia de nascimento e de início do período de desnutrição. Este diferencial cresceu até atingir seu ponto máximo de 46,4 % no 7º dia ($p < 0,001$). Após o 14º dia ocorreu uma recuperação gradual de peso do grupo Desnutrido, com um ganho de peso 23,4% maior que o do grupo Controle durante a 2ª semana. Nos últimos três dias de estudo (21º a 24º dia), o diferencial de peso entre os 2 grupos estabilizou-se ao redor de 33%.

A evolução individual do ganho de peso dos ratos foi muito variável (Tabela 3.4). O rato C15 do grupo Controle foi o de maior peso corporal ao nascimento de todos os ratos filhotes (6,81 g), evoluiu mais lentamente e no 24º dia pesava 44,3 g, correspondendo ao antepenúltimo (13º) peso no seu grupo. O rato D4 do grupo Desnutrido, o 2º maior peso corporal ao nascimento de todos os ratos filhotes (6,13 g) e o de maior peso no seu grupo, pesava no 24º dia 36,7 g, persistindo como o mais pesado do seu grupo, no entanto estava abaixo do peso do menor rato do grupo Controle (rato C14 - 43,9 g).

Tabela 3.4 - Evolução do peso médio dos ratos

		Dias de Vida							
		0	1	7	14	21	22	23	24
Peso Médio (em gramas)	Controle	5,70	6,79	16,15	28,23	38,77	41,25	43,81	47,05
	Desnutrido	5,35	5,92	8,66	17,16	23,55	26,81	29,53	31,51
	Valor “p” ≤	0,0094	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
	% Variação Peso *	6,19	12,85	46,39	39,21	39,24	34,99	32,61	33,03
% Ganho de Peso	Controle		19,08	137,81	74,74	37,34	6,40	6,22	7,40
	Desnutrido		10,62	46,29	98,15	37,26	13,84	10,12	6,73
	% Variação Ganho de Peso *		44,34	66,41	- 31,32	0,21	- 116,25	- 62,70	9,05

* Controle / Desnutrido

O rato C1 obteve o maior ganho individual de peso (969%) de ambos os grupos e o rato D12 alcançou um ganho individual de peso de 640%, o maior do grupo Desnutrido, inferior porém ao menor ganho de peso do grupo Controle (rato C15 – 650%).

3.1.3 Caracterização da Gravidade da Desnutrição

O parâmetro utilizado para comprovar e quantificar a presença e o grau de desnutrição energético-protéica foi a comparação entre o ganho médio de peso dos 2 grupos durante o período de experimentação.

3.2 Retirada do Músculo Gastrocnêmio

No 24^o dia de vida, os ratos dos grupos Controle e Desnutrido, foram anestesiados com éter e submetidos à esternectomia, seguida por punção ventricular cardíaca com aspiração de sangue até a assistolia. A seguir, realizou-se dissecação da perna direita, identificando-se os tendões dos músculos gastrocnêmio, sóleo e plantar e removeu-se todo o músculo gastrocnêmio [Greene 1959].

Utilizou-se para montagem do músculo um suporte metálico, identificado com o número do rato e o grupo ao qual pertencia (por exemplo: C7 correspondia ao rato 7 do grupo Controle e D2 correspondia ao rato 2 do grupo Desnutrido), recoberto de goma de Adragacanth a 7%.

O músculo gastrocnêmio era posicionado sobre a goma, com seu mais longo segmento, o longitudinal, colocado em sentido vertical e imediatamente recoberto com talco em pó, sendo congelado por imersão em nitrogênio líquido. Os espécimes eram mantidos em nitrogênio líquido a -170° e transportados até o Laboratório de Histoquímica do Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR (Curitiba, Paraná), onde foram estocados até o processamento.

3.3 Técnicas de Coloração à Fresco e Histoquímica Muscular

O bloco (suporte metálico, a goma de Adragacanth e o músculo) foi colocado em um criostato com temperatura ambiente a -20° C, onde o músculo foi submetido a cortes de 10 micras de espessura na sua porção média, sendo as seções obtidas montadas em lamínulas de 22 x 22 mm.

As seções de tecido muscular foram processadas conforme as técnicas usuais do Laboratório de Histoquímica do Hospital de Clínicas da UFPR [Werneck 1981] referidas abaixo.

Colorações a fresco:

- 1 - Hematoxilina-Eosina
- 2 - Tricromo de Gomori modificado por Engel e Cunnighan
- 3 - Ácido Periódico de Schiff (PAS)
- 4 – Óleo Vermelho O ("oil red O")
- 5 - Cresil Violeta.

Reações histoquímicas:

- 1 - ATPase alcalina com pH 9.4
- 2 - ATPase ácida com pH 4.6
- 3 - ATPase ácida com pH 4.3
- 4 - NADH Tetrazolium Redutase (NADH -TR)

- 5 - Desidrogenase Succínica (SDH)
- 6 - Esterase Inespecífica
- 7 - Fosfatase Ácida
- 8 - Fosfatase Alcalina

Para análise do material empregamos um microscópio óptico marca Olympus modelo BH, de Olympus Optical Company, Ltd., Tóquio - Japão, com aumentos variáveis de 50 a 400 x e máquina fotográfica acoplada.

3.4 Tipos de Alterações Histológicas Analisadas

Os fragmentos do músculo gastrocnêmio direito dos 30 ratos dos grupos Controle e Desnutridos, corados a fresco e submetidos às reações histoquímicas e colorimétricas especificadas no item anterior, foram analisados de forma não sequencial e “as cegas”, isto é, sem que se tivesse conhecimento de qual grupo em estudo provinha o espécime. Durante o processo de análise foram identificadas e classificadas conforme a gravidade as alterações histológicas sugestivas de processos patológicos neuromusculares [Dubowitz & Brooke 1973, Werneck 1981], abaixo relacionadas:

A - Tecido Conjuntivo Endomesial Aumentado

B - Infiltração por Tecido Adiposo

C - Nervos

- fibrose
- reação celular
- alteração na mielina
- depósito de amilóide

D - Vasos

- paredes espessadas
- reação inflamatória

E - Diâmetro, Morfologia e Distribuição das Fibras

- atroficas e hipertróficas
- angulares pequenas
- arredondadas
- atrofia de pequenos e de grandes grupos
- atrofia perifascicular

F - Núcleos

- internos ou centrais
- vesiculares
- picnóticos e agrupados

G - Estrutura Interna das Fibras

- necrose simples
- fagocitose
- basofilia
- segmentação ("splitting")
- fibras granulares ("ragged reds")
- agregados tubulares
- corpos nemalínicos
- massas sarcoplásmicas
- vacúolos
- infiltrado inflamatório

H - Comportamento Histoquímico das Fibras

- predomínio de fibras tipo 1 ou 2
- deficiência de fibras tipo 1 ou 2
- atrofia de fibras tipo 1 e/ou 2
- hipertrofia de fibras tipo 1 e/ou 2
- agrupamentos ("grouping")
- variações na distribuição da fibra

I - Alterações Estruturais Específicas de Fibras nas Reações Histoquímicas

- angular escura atrófica
- déficit focal de enzima ("moth eaten" ou saca-bocado)
- turbilhão ("whorl")
- alvo ("target")
- core central
- enrodilhamento ("snake coil")
- fibra em anel
- atividade aumentada da fosfatase alcalina nas fibras e no interstício
- atividade aumentada da fosfatase ácida nas fibras e no interstício
- esterase inespecífica - fibras angulares escuras atróficas e placas motoras
- deficiência de miofosforilase
- acúmulo de lipídios intracelular (vacúolos) ou intersticial
- acúmulo de glicogênio intracelular (vacúolos)

Adaptado de [Werneck 1981]

Quando presente alguma destas alterações, a sua gravidade era classificada pelos critérios abaixo:

Grau 0 - ausência de alterações

Grau + - presença de alterações raras e/ou discretas

Grau ++ - presença de alterações ocasionais e/ou moderadas

Grau +++ - presença de alterações freqüentes e/ou graves

3.5 Identificação dos Tipos de Fibras Musculares

O músculo gastrocnêmio do rato de 24 dias de vida, processado pela reação da ATPase pH 4.3 apresenta 3 tipos de fibra muscular [Banker e Engel 1994, Brooke e Kaiser 1970, Sher e Cardasis 1976] :

Tipo 1 - mais escuras e com grande diâmetro

Tipo 2a - mais claras e com grande diâmetro

Tipo 2b - coloração intermediária e diâmetros intermediário

As fibras musculares, contidas completamente no interior das fotografias da porção medial interna do músculo gastrocnêmio, excluindo-se as fibras que apresentassem artefatos variados, eram identificadas conforme a classificação acima.

3.6 Análise Histográfica da Área das Fibras Musculares

A medida da área de uma fibra muscular foi obtida com a técnica de contagem do número de quadrados contidos integralmente no seu interior [Enström & Torlegard 1969].

Selecionou-se 10 seções musculares dos ratos de cada grupo, cujas lâminas processadas pela ATPase 4.3 apresentavam a melhor diferenciação dos tipos de fibra, os limites mais precisos das fibras musculares, poucos artefatos e que melhor evidenciavam a porção medial interna do gastrocnêmio. Estas regiões foram fotografadas com aumento de 200 x e ampliadas em fotos coloridas de 13x18 cm.

As fibras musculares contidas integralmente dentro da ampliação fotográfica foram numeradas e classificadas como de tipo 1, 2a ou 2b (Figura 3.2).

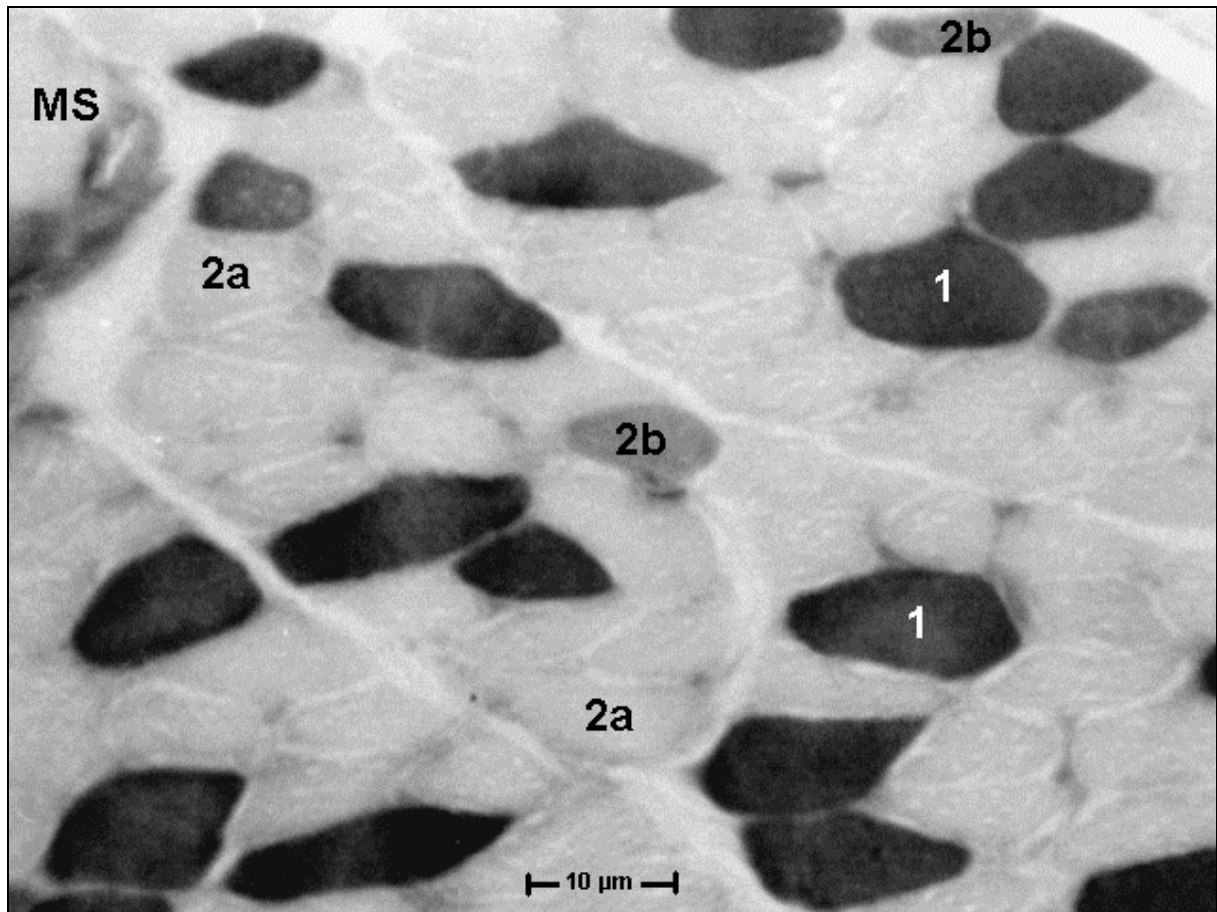
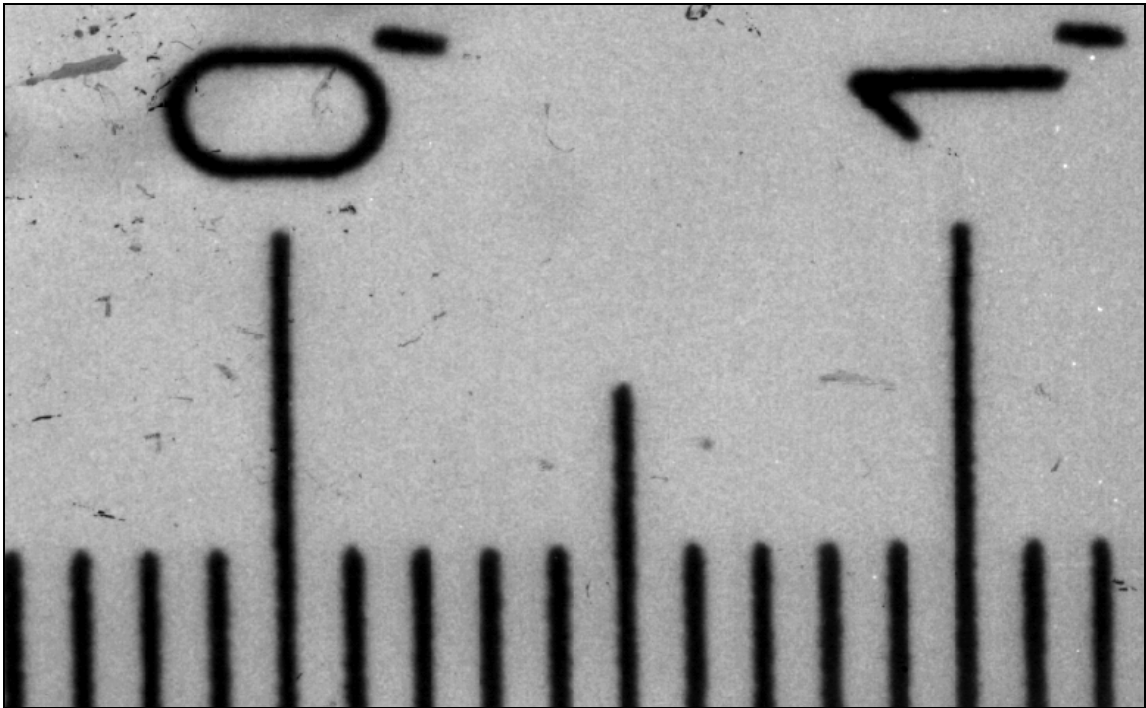


Figura 3.2 - Tipo de fibras musculares ATPase 4.3
1 – fibras tipo 1; 2a – fibras tipo 2a; 2b – fibras tipo 2b; MS – fuso muscular
zona interna do músculo gastrocnêmio (rato controle)

Em cada seqüência de fotografias realizadas, foi também fotografada uma escala padrão micrométrica de 2 mm, subdividida em intervalos de 0,01 mm, submetida a mesma ampliação fotográfica (Figura 3.3).



**Figura 3.3 - Fotografia da escala micrométrica padrão
200x**

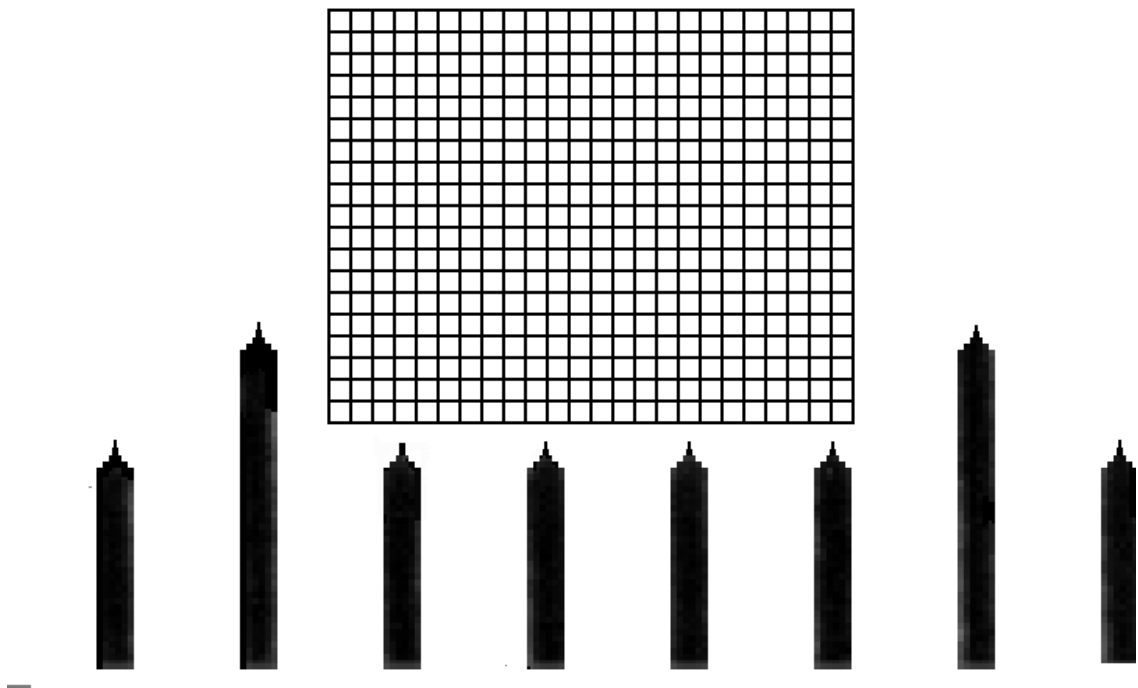


Figura 3.4 - Tela quadriculada para medida da área das fibras musculares
(quadrados de $2,25 \mu^2$ de área, com traços verticais correspondendo as marcas originais da escala micrométrica)

A fotografia desta escala micrométrica foi digitalizada e processada para acentuar o contraste e bordos dos traços. Sobre esta imagem digitalizada construiu-se uma tela quadriculada, composta por quadrados de 1,5 micras de lado e 2,25 micras quadradas de área (Figura 3.4). Esta tela era impressa em uma lâmina transparente de acetato, juntamente com a escala micrométrica. O resultado final era conferido com a fotografia matriz para detecção de distorções de impressão.

A tela quadriculada era colocada sobre uma fibra muscular situada integralmente no interior da cópia fotográfica, excluindo-se as fibras que apresentassem artefatos variados. Procurava-se distribuir os quadrados na fibra, de forma a conter integralmente no interior do contorno da fibra o maior número possível de quadrados. Quando mais de 50% da área de um quadrado localizava-se no interior da fibra ele foi considerado como contido. A contagem do número de quadrados contidos no interior de cada fibra foi feita aleatoriamente e sem conhecimento do grupo em estudo a que pertencia o rato.

A área em micras de cada fibra era calculada multiplicando-se o número de quadrados contados no interior de cada fibra por 2.25 (área de um quadrado).

3.7 *Análise Estatística*

Considerou-se que cada rato correspondia a uma unidade, com as séries de ratos de cada grupo constituindo amostras independentes intra e entre grupos, com distribuição não normal. A hipótese a ser comprovada é a ausência de diferenças entre elas.

As séries de peso e área média dos tipos de fibras dos ratos dos Grupos Controle e Desnutrido foram comparadas pelo teste "t" de Student bidirecional para amostras independentes com correção de Welch.

A frequência de distribuição da área dos vários tipos de fibras musculares nos Grupos Controle e Desnutridos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney, considerando a área média de cada tipo de fibra de cada rato do grupo Controle como uma unidade independente a ser comparada com o grupo Desnutrido. Considerou-se ser este teste apropriado para testar a hipótese nula de que as funções distributi-

vas são iguais nos dois grupos versus a hipótese alternativa de terem distribuições diferentes [Conover 1980].

Para todos os testes, as diferenças entre as médias eram consideradas estatisticamente significativas quando eram obtidos valores de “p” menores que 0,05 ($p < 0,05$) [Colton 1974].

Resultados

4.1 Alterações Musculares Histoquímicas e Colorimétricas

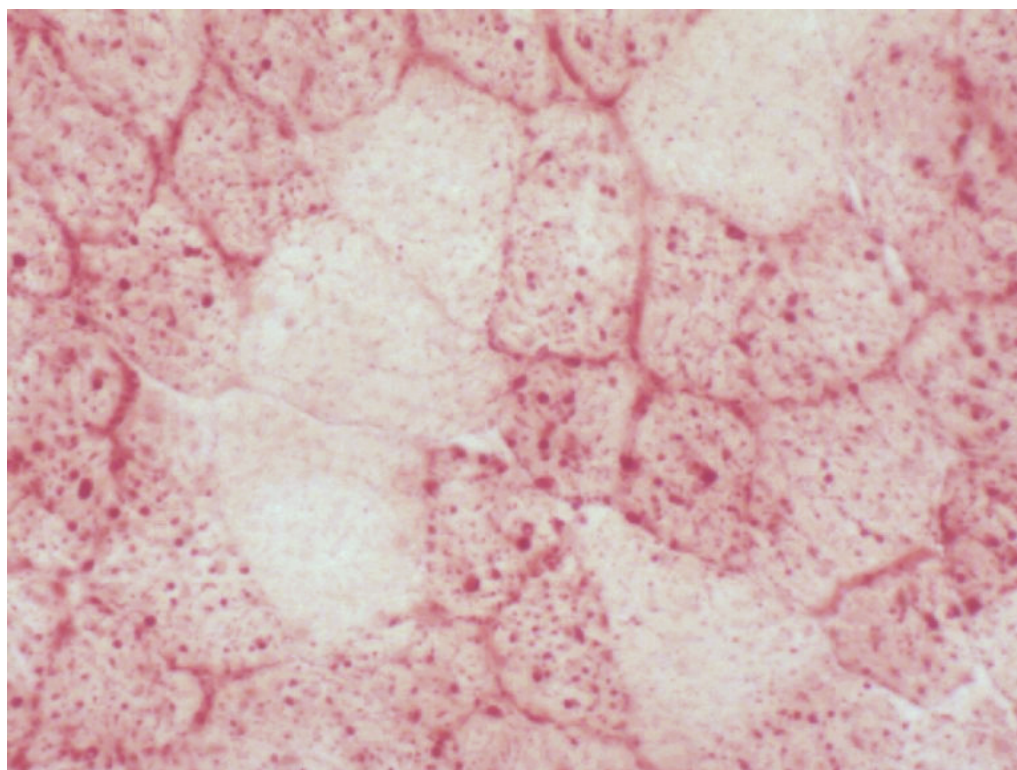
Foram analisadas 30 seções transversas do nível médio do músculo gastrocnêmico de 15 ratos filhotes do grupo Controle e 15 ratos filhotes do grupo Desnutrido. Observou-se em ambos os grupos variações no diâmetro e distribuição das fibras musculares, conforme as diversas áreas do músculo gastrocnêmio. Na comparação entre os grupos em estudo, a única alteração estatisticamente significativa ($p = 0,0002$) foi uma discreta redução de lipídios no interior das fibras musculares (Figura 4.1) em 5 ratos do grupo Controle (C2, C4, C9, C11, C13) e em todos os 15 ratos do grupo Desnutrido. Não foram detectadas outras anormalidades colorimétricas ou histoquímicas específicas ou sugestivas de patologias neuromusculares nas 30 seções examinadas.

4.2 Análise Histográfica dos Tipos de Fibras Musculares

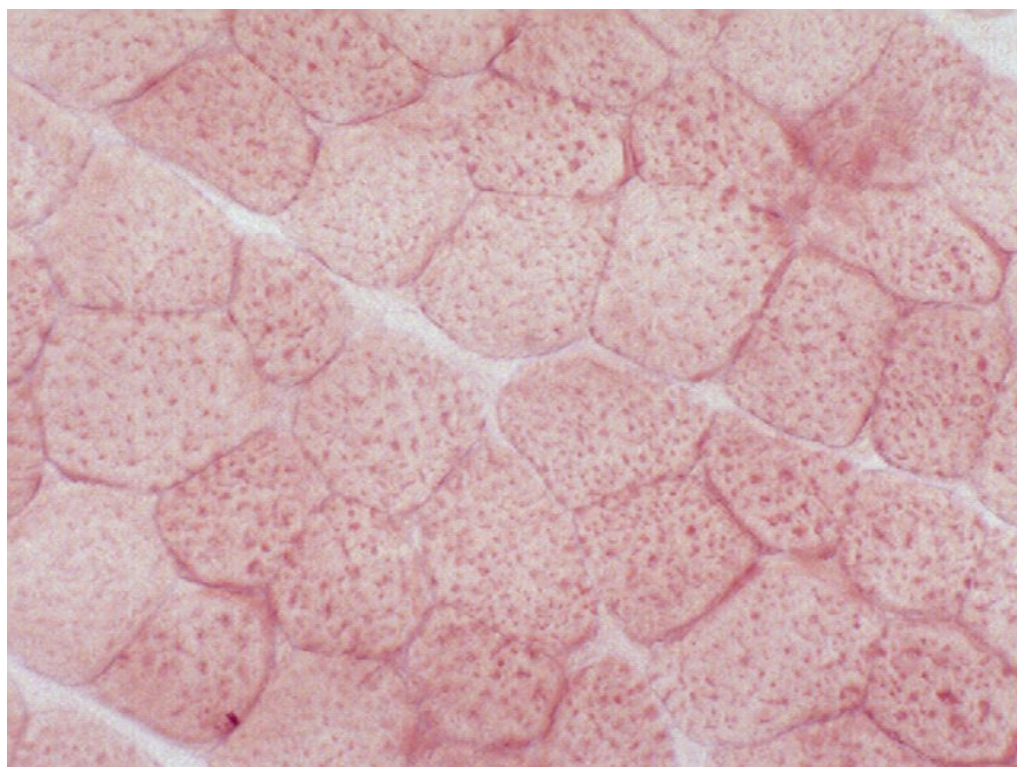
Utilizando a técnica da retícula quadrada para medição da área das fibras da porção interna do músculo gastrocnêmio corado pela ATPase 4.3, foram medidas 3 929 fibras musculares, sendo 1 666 fibras em 10 ratos (C1, C3, C4, C5, C6, C7, C9, C11, C12 e C14) do grupo Controle e 2 263 fibras em 10 ratos (D3, D4, D5, D6, D7, D9, D10, D11, D13 e D15) do grupo Desnutrido, escolhidos entre os 15 ratos de cada grupo em estudo conforme os critérios descritos anteriormente (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Número de fibras musculares medidas - ATPase 4.3

Tipo de Fibras	Grupo Controle (N = 10)	Grupo Desnutrido (N = 10)	TOTAL
Tipo 1	316 (19,0%)	511 (22,6%)	827 (21,0%)
Tipo 2a	614 (36,8%)	1 045 (46,2%)	1 659 (42,2%)
Tipo 2b	736 (44,2%)	707 (31,2%)	1 443 (36,8%)
TOTAL	1 666 (100%)	2 263 (100%)	3 929 (100%)

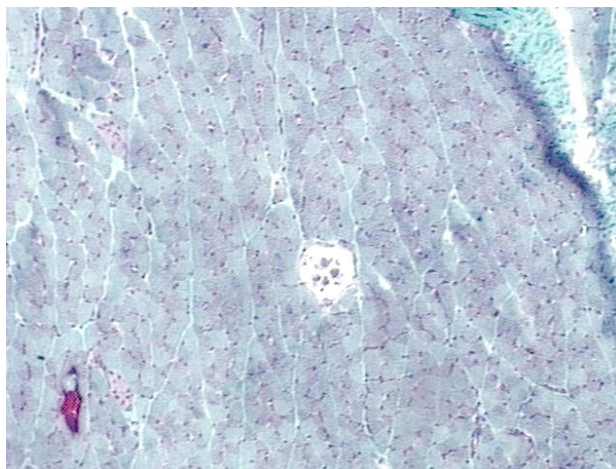


Rato C2

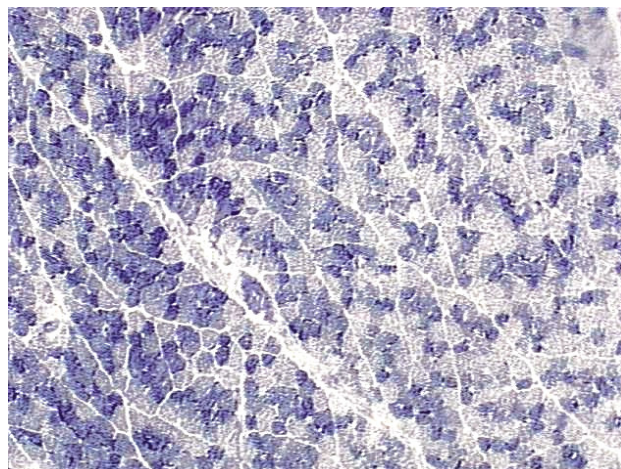


Rato D4

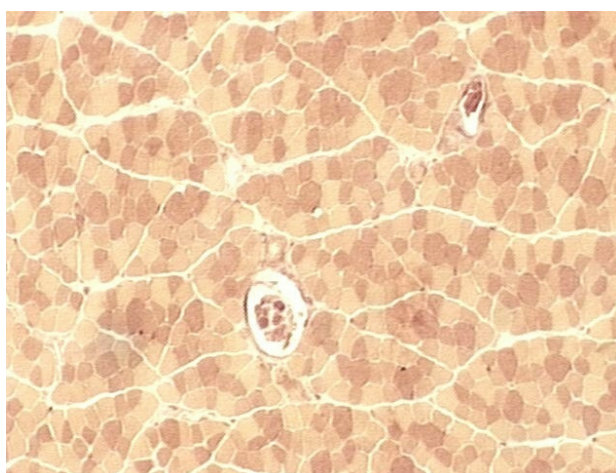
**Figura 4.1 - Lipídios no interior das fibras musculares
músculo gastrocnêmio; "Oil Red O"; 400x**



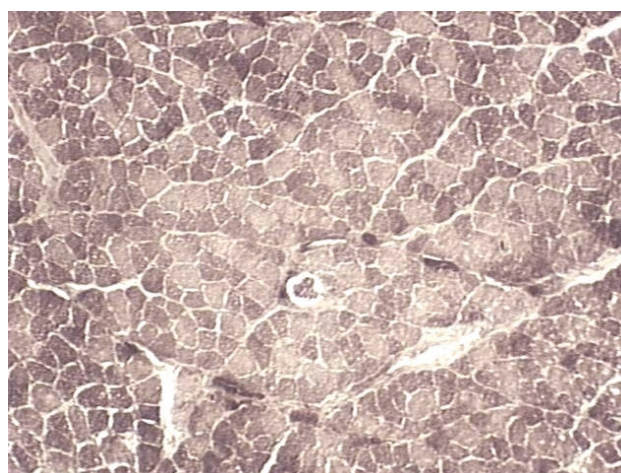
Rato D3 – Tricromo de Gomori modificado



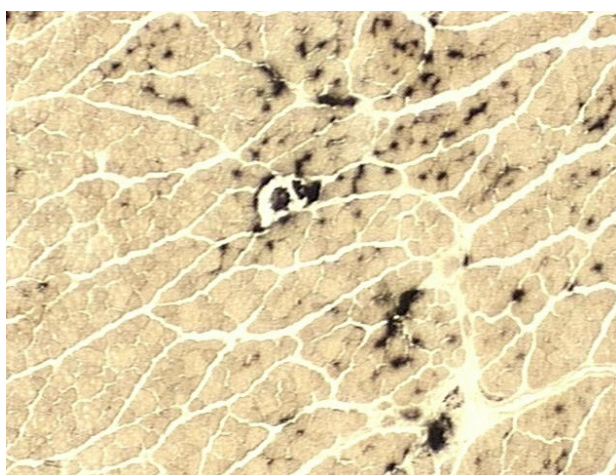
Rato D1 - DPNH



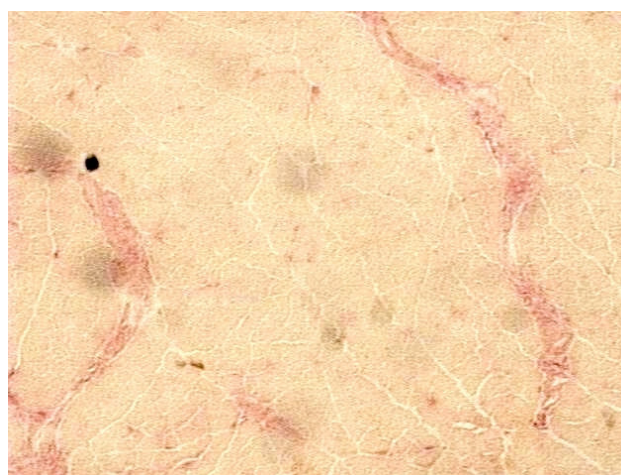
Rato D3 - Esterase



Rato D13 – ATPase 9.4



Rato D12 - Fosfatase Alcalina



Rato D14 - Fosfatase Ácida

Figura 4.6 - Fuso muscular e tipos de fibras em diversas colorações
zona interna músculo gastrocnêmio - 200x

4.2.1 Área das Fibras Tipo 1

A área média das fibras Tipo 1 no grupo Controle foi de $64,69 \pm 17,89$ micras e de $51,27 \pm 12,51$ micras no grupo Desnutrido (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 - Área das fibras tipo 1 - ATPase 4.3 (em micras)

Grupo Controle					
Rato	Nº Fibras	Área Média	Desvio Padrão	Menor Área	Maior Área
C1	38	45,30	9,39	18,00	63,00
C3	26	44,05	11,33	22,50	67,50
C4	46	68,33	14,48	33,75	96,75
C5	22	91,02	30,07	33,75	135,00
C6	14	48,05	11,93	20,25	60,75
C7	56	68,54	15,48	29,25	101,25
C9	30	57,68	18,70	15,75	83,25
C11	20	95,06	29,73	36,00	150,75
C12	9	71,75	20,45	33,75	108,00
C14	55	57,07	13,67	24,75	108,00
CONTROLE	316	64,69	17,89	44,05	95,06
Grupo Desnutrido					
Rato	Nº Fibras	Área Média	Desvio Padrão	Menor Área	Maior Área
D3	74	49,77	10,28	18,00	76,50
D4	60	73,20	17,20	15,75	103,50
D5	42	31,55	11,27	13,50	56,25
D6	21	39,32	12,70	24,75	63,00
D7	49	42,15	7,50	31,50	65,25
D9	88	42,11	8,68	15,75	60,75
D10	40	60,53	23,28	27,00	96,75
D11	40	58,50	23,47	22,50	112,50
D13	20	58,95	18,42	24,75	85,50
D15	77	56,66	10,24	29,25	85,50
DESNUTRIDO	511	51,27	12,51	31,55	73,20

$p = 0,0678$

Nº - número

4.2.2 Área das Fibras Tipo 2a

A área média das fibras Tipo 2a no grupo Controle foi de $52,37 \pm 13,37$ micras e de $38,19 \pm 11,71$ micras no grupo Desnutrido (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 - Área das fibras tipo 2a - ATPase 4.3 (em micras)

Grupo Controle					
Rato	Nº Fibras	Área Média	Desvio Padrão	Menor Área	Maior Área
C1	79	39,42	8,96	15,75	76,50
C3	64	31,29	10,51	15,75	72,00
C4	30	46,95	10,27	29,25	74,25
C5	75	71,79	19,95	29,25	119,25
C6	28	60,11	12,53	42,75	83,25
C7	53	41,73	14,42	18,00	90,00
C9	66	45,95	16,67	20,25	112,50
C11	90	72,53	27,66	20,25	173,25
C12	47	60,22	13,53	31,50	90,00
C14	82	53,75	20,37	27,00	121,50
CONTRÔLE	614	52,37	13,76	31,29	72,53
Grupo Desnutrido					
Rato	Nº Fibras	Área Média	Desvio Padrão	Menor Área	Maior Área
D3	113	36,12	9,08	15,75	69,75
D4	84	41,41	15,35	13,50	87,75
D5	58	29,98	9,07	13,50	49,50
D6	59	54,69	14,61	15,75	76,50
D7	209	22,20	7,36	9,00	47,25
D9	171	21,96	8,53	6,75	56,25
D10	64	52,31	12,05	24,75	83,25
D11	61	50,61	18,78	18,00	105,75
D13	112	36,36	8,43	15,75	60,75
D15	114	36,28	13,44	9,00	78,75
DESNUTRIDO	1045	38,19	11,71	21,96	36,36

$p = 0,0231$

Nº - número

4.2.3 Área das Fibras Tipo 2b

A área média das fibras Tipo 2b no grupo Controle foi de $36,22 \pm 8,24$ micras e de $26,03 \pm 7,52$ micras no grupo Desnutrido (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 - Área das fibras tipo 2b - ATPase 4.3 (em micras)

Grupo Controle					
Rato	Nº Fibras	Área Média	Desvio Padrão	Menor Área	Maior Área
C1	149	22,73	5,80	6,75	40,50
C3	136	39,28	14,47	6,75	90,00
C4	95	35,19	8,40	18,00	78,75
C5	4	46,13	14,98	24,75	58,50
C6	108	34,69	12,95	13,50	67,50
C7	17	36,93	8,27	27,00	56,25
C9	122	29,77	10,76	11,25	56,25
C11	11	47,66	9,59	36,00	63,00
C12	81	43,36	15,43	6,75	87,75
C14	13	26,48	10,15	13,50	47,25
CONTRÔLE	736	36,22	8,24	22,73	47,66
Grupo Desnutrido					
Rato	Nº Fibras	Área Média	Desvio Padrão	Menor Área	Maior Área
D3	17	21,18	7,80	4,50	33,75
D4	20	29,93	9,90	11,25	54,00
D5	187	19,36	7,46	6,75	69,75
D6	135	34,40	13,30	6,75	78,75
D7	70	16,78	4,73	9,00	29,25
D9	47	17,52	4,83	9,00	27,00
D10	83	34,97	6,66	20,25	49,50
D11	78	36,61	10,98	20,25	85,25
D13	43	25,95	4,03	18,00	38,25
D15	27	23,58	10,56	6,75	56,25
DESNUTRIDO	707	26,03	7,52	16,78	36,61

p = 0,0098

Nº - número

4.2.4 Área de Todas as Fibras

A área média de todas as fibras no grupo Controle foi de $33,48 \pm 13,31$ micras e de $26,49 \pm 11,86$ micras no grupo Desnutrido (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 - Área de todas as fibras - ATPase 4.3

Grupo Controle					
Tipo de Fibra	Nº Fibras	Área Média	Desvio Padrão	Menor Área	Maior Área
1	316	64,69	17,89	15,57	150,75
2a	614	52,37	13,76	15,75	173,25
2b	736	36,22	8,24	6,75	90,00
Todos	1 666	51,09	17,88	6,75	173,25
Grupo Desnutrido					
Tipo de Fibra	Nº Fibras	Área Média	Desvio Padrão	Menor Área	Maior Área
1	511	51,27	12,51	13,50	112,50
2a	1045	38,19	11,71	6,75	105,75
2b	707	26,03	7,52	4,50	85,50
Todos	2 263	38,50	14,78	4,50	112,5

4.3 *Frequência dos Tipos de Fibras em Relação à Área das Fibras Musculares*

A frequência de distribuição da área dos tipos de fibras musculares por faixas de $10 \mu^2$ (Tabela 4.6) dos ratos do grupo Desnutrido têm um histograma de frequência demonstrando uma tendência ao desvio para a esquerda (fibras de menor área) em relação ao histograma de frequência dos ratos do grupo Controle (Figuras 4.3 e 4.4).

A comparação da frequência de distribuição dos vários tipos de fibras entre os dois grupos evidencia a presença de fibras menores no grupo Desnutrido e é estatisticamente significativa para as fibras tipo 2a e 2b, não sendo significativa para as fibras tipo 1 (Tabela 4.7).

Tabela 4.6 - Distribuição conforme o tipo e a área média da seção transversal das fibras musculares – ATPase 4.3

Área (μ^2)	Tipo 1				Tipo 2a				Tipo 2b			
	Controle		Desnutrido		Controle		Desnutrido		Controle		Desnutrido	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
10							9	0,9	5	0,7	19	2,7
20	3	0,9	11	2,2	7	1,1	177	16,9	86	11,7	203	28,7
30	12	3,8	35	6,8	66	10,7	300	28,7	246	33,4	263	37,2
40	16	5,1	78	13,3	114	18,6	232	22,2	190	25,8	118	16,7
50	60	19,0	163	31,9	140	22,8	176	16,8	133	18,1	79	11,2
60	67	21,2	73	14,3	92	15,0	73	7,0	46	6,3	18	2,5
70	65	20,6	74	14,5	76	12,4	52	5,0	17	2,3	4	0,6
80	35	11,1	39	7,6	48	7,8	17	1,6	10	1,4	1	0,1
90	21	6,6	27	5,3	34	5,5	6	0,6	3	0,4	2	0,3
100	7	2,2	8	1,6	15	2,4	2	0,2				
110	18	5,7	2	0,4	6	1,0	1	0,1				
120	7	2,2	1	0,2	10	1,6						
130	3	0,9			2	0,3						
140	1	0,3										
150					2	0,3						
160	1	0,3			1	0,2						
170					0							
180					1	0,2						
Total	316		511		614		1045		736		707	
Total Grupo Controle :				1 666				Total Grupo Desnutrido :				2 263

Tabela 4.7 - Frequência das tipos de fibras em relação a área da fibra muscular - ATPase 4.3 (em micras)

Grupo Controle

Rato	Tipo 1	Tipo 2a	Tipo 2b
C1	45,30	39,42	22,73
C3	44,05	31,29	39,28
C4	68,33	46,95	35,19
C5	91,02	71,79	46,13
C6	48,05	60,11	34,69
C7	68,54	41,73	36,93
C9	57,68	45,95	29,77
C11	95,06	72,53	47,66
C12	71,75	60,22	43,36
C14	57,07	53,75	26,48
MÉDIA	64,69	52,37	36,22
Desvio Padrão	17,89	13,76	8,24

Grupo Desnutrido

Rato	Tipo 1	Tipo 2a	Tipo 2b
D3	49,77	36,12	21,18
D4	73,20	41,41	29,93
D5	31,55	29,98	19,36
D6	39,32	54,69	34,40
D7	42,15	22,20	16,78
D9	42,11	21,96	17,52
D10	60,53	52,31	34,97
D11	58,50	50,61	36,61
D13	58,95	36,36	25,95
D15	56,66	36,28	23,58
MÉDIA	51,27	38,19	26,03
Desvio Padrão	12,51	11,71	7,52
Valor “ p “	0,1230	0,0288	0,0115

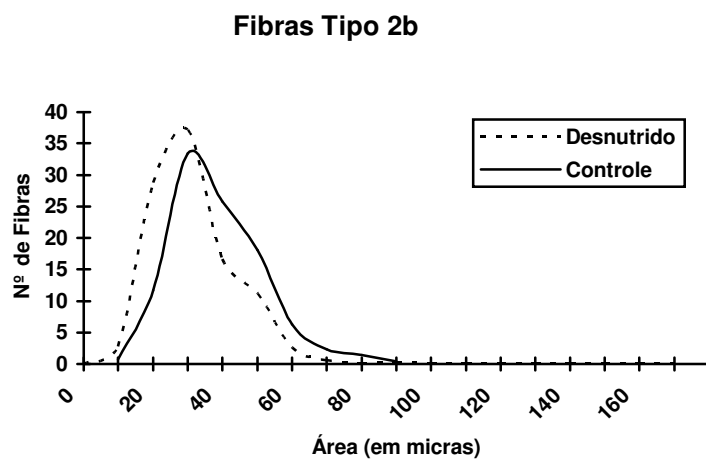
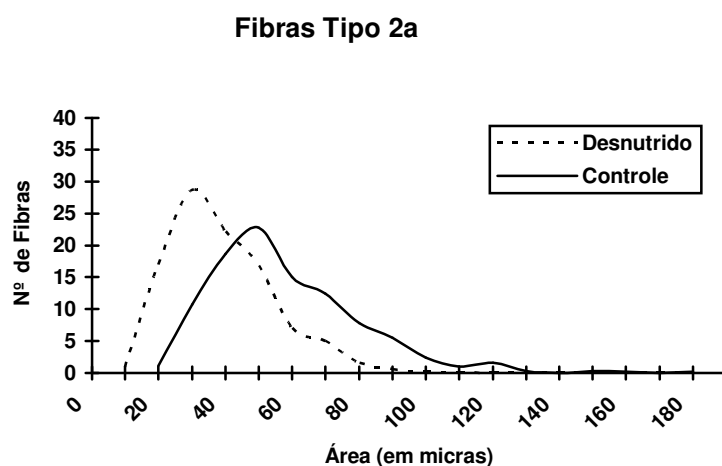
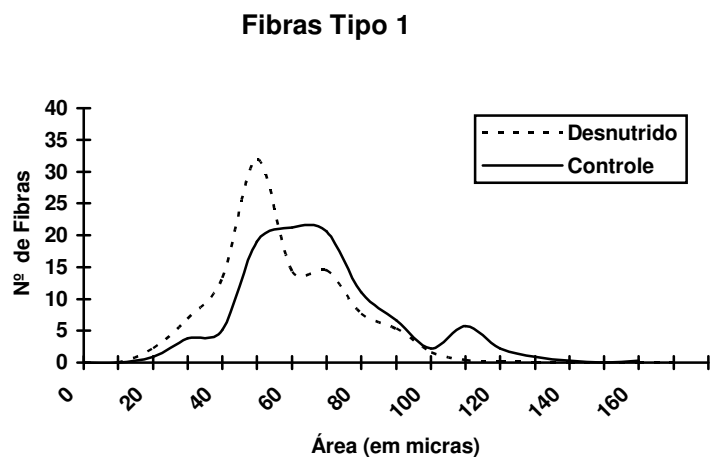


Figura 4.7 - Distribuição por tipos de fibras musculares
músculo gastrocnêmio - ATPase 4.3

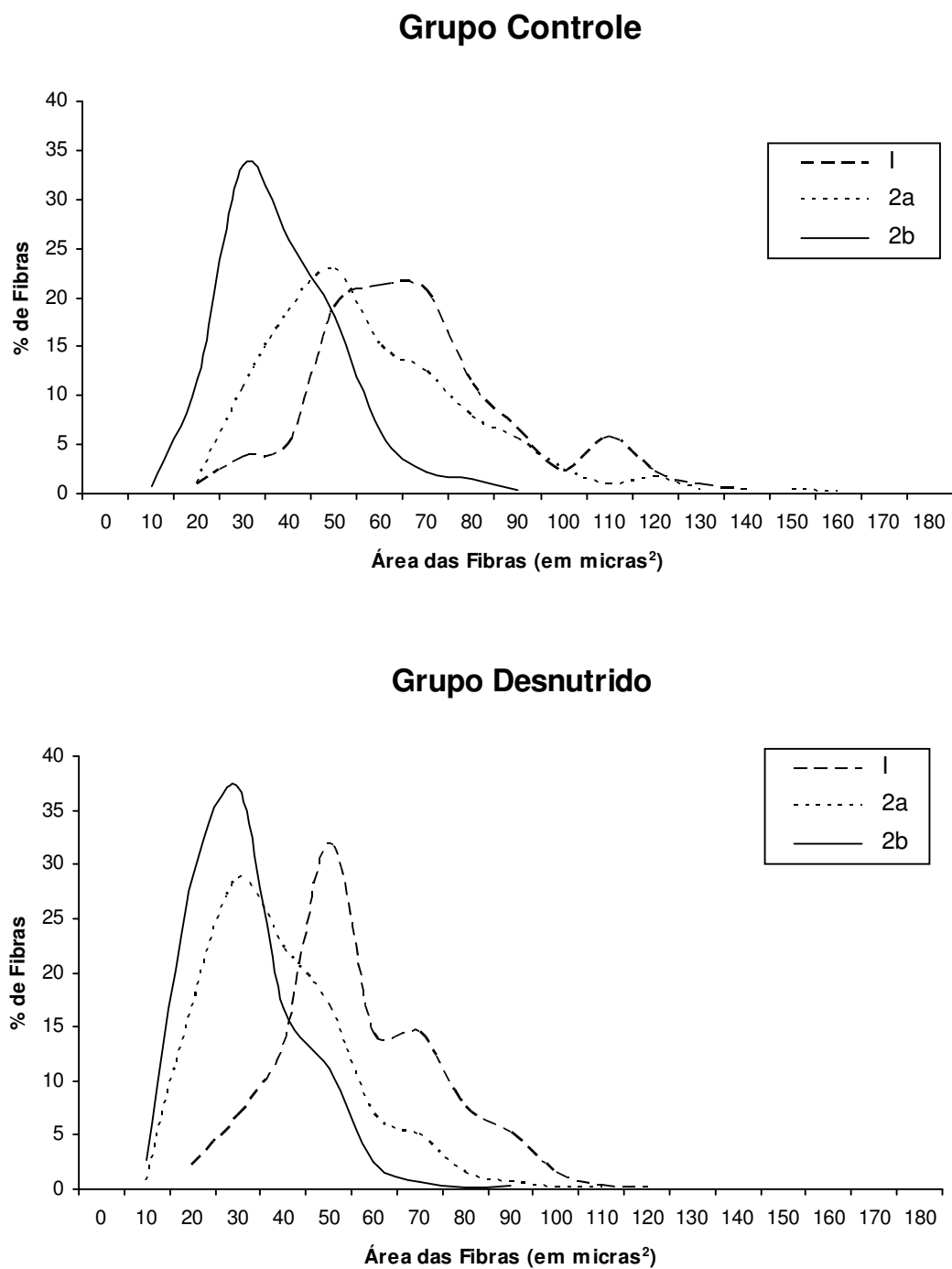


Figura 4.8 - Distribuição dos tipos de fibras musculares por grupo
músculo gastrocnêmio - ATPase 4.3

Discussão

5.1 DEP exclusivamente durante o aleitamento

Os principais estudos da DEP em ratos, efetuados com avaliação histoquímica e morfológica do músculo e análise quantitativa e qualitativa das fibras musculares, foram realizados durante o período de gestação e aleitamento, seguidos ou não de períodos de recuperação nutricional [Bedy e col. 1982, Cavalieri e col. 1986, Haltia e col. 1978, Hegarty e Kim 1980, Howell e col. 1978 e 1979 a, Nascimento e col. 1990 e Oliveira e col. 1999]. Nestes estudos observa-se a presença de alterações significativas e persistentes na DEP ocorrida durante a gestação e o aleitamento (Tabela 1.2), não sendo possível determinar em qual destas fases o músculo é mais susceptível as alterações ocasionadas pela DEP e também quais seriam as alterações histoquímicas, morfológicas e quantitativas desencadeadas pela DEP em cada um destas fases.

A escolha do período de aleitamento (do nascimento até o 24º dia de vida) para estudar os efeitos da DEP, é adequada por ser este um período de grande crescimento corporal, com acelerada maturação do sistema nervoso central e músculo esquelético, particularmente no animal em estudo – o rato.

A fase de crescimento mais acelerado do cérebro do rato, denominada crescimento explosivo ou “growth spurt”, ocorre no período que vai do nascimento até o 24º dia de vida, que é também o período de desnutrição neste estudo. Este período caracteriza-se, na sua 1ª metade, por uma intensa multiplicação glial e na sua metade final por uma rápida mielinização [Davidson e Dobbing 1966]. Em humanos o período equivalente inicia-se na metade final do período gestacional e estende-se até o 3º e 4º ano de vida [Dobbing 1974]. Devido ao rápido crescimento, o cérebro em desenvolvimento torna-se muito suscetível aos efeitos da desnutrição nesta fase.

O modelo de DEP utilizado - diminuição da quantidade com manutenção da qualidade da ingesta, é alcançado pela redução de 6 horas no período de aleitamento e na duplicação do número de lactentes por rata-nutriz, mantendo-se a alimentação adequada *ad libitum* para as rata-nutrizes. Desta maneira evita-se a desnutrição da rata nutriz e assegura aos ratos filhotes uma ingesta balanceada e completa (leite materno), mas em quantidade reduzida, e não ocorre uma carência absoluta de nenhum fator essencial que possa confundir os achados. Este modelo, aplicado exclu-

sivamente durante o período de aleitamento (até 24^o dia de vida) em ratos recém nascidos eutróficos, provocou uma redução de 33% do peso corporal. Em crianças tal grau de redução de peso equivaleria a uma desnutrição moderada ou de 2^o grau, se utilizarmos a Classificação de Gómez [Gomez e col. 1953].

Por serem estudados apenas ratos machos, não ocorreu variação nas taxas de ganho de peso e de diferenciação das fibras musculares decorrentes do sexo do espécime [Howells e col. 1979].

As gestações das 9 ratas-mães transcorreram sem intercorrências, com um ganho médio de peso corporal de 46%. Ao nascimento os ratos-filhotes apresentaram um peso médio dentro dos padrões normais nesta faixa etária para ratos da cepa Wistar de *Rattus Norvegicus* do Biotério do Laboratório Experimental do Departamento de Pediatria da Universidade Federal de São Paulo. Desta forma, comprovase não ter ocorrido desnutrição durante o período de gestação e que os ratos-filhotes eram eutróficos ao iniciar-se o estudo.

As curvas de ganho de peso mostram que enquanto o pico de ganho de peso dos ratos controle ocorreu durante a 1^a semana de aleitamento, o dos ratos desnutridos ocorreu durante a 2^a semana. A partir da 3^a semana as duas curvas correm paralelas, sem uma evidente recuperação do peso, que porventura poderia ter ocorrido após o 24^o dia.

O fator que realmente influenciou o peso final do rato foi o ganho de peso e não o peso inicial. Caso os ratos desnutridos tivessem um peso médio inicial igual ao peso médio inicial dos ratos controle, e mantivessem o mesmo percentual de ganho médio de peso do grupo Desnutrido, ao final dos 24 dias teriam um peso médio de 33,6 gramas, apenas 6,60 % superior ao peso médio final real do grupo Desnutrido. Mesmo o maior ganho individual de peso no grupo Desnutrido (640%) foi inferior ao menor ganho de peso individual no grupo Controle (650%).

As diferenças no peso corporal entre os dois grupos em estudo de 33% deve-se a DEP, que foi a única variável significativa e conhecida entre os grupos em estudo.

5.2 Alterações Histoquímicas e Colorimétricas no Músculo

A ausência de anormalidades histoquímicas e colorimétricas no músculo gastrocnêmio, exceto a redução de lipídios no interior das fibras, são compatíveis com o observado em outros estudos no músculo de animais e humanos, utilizando métodos histoquímicos e colorimétricos processados a fresco, onde a gravidade das alterações é relacionada ao tipo, período e intensidade da desnutrição e também a metodologia de investigação [Bedy e col. 1982, Cavaliere e col. 1986, Dastur e col. 1982, Haltia e col. 1978, Hegarty e Kim 1980, Howells e col. 1978 e 1979, Lancellotti e col. 1988, Nascimento e col. 1990, Oliveira e col. 1999, Yamaguchi e col. 1992].

A única diferença estatisticamente significativa, a redução de lipídios nos ratos do grupo Desnutrido, deve estar relacionado ao menor peso, a menor taxa de gordura corporal ou a uma maior taxa de metabolismo oxidativo. Em humanos o conteúdo de gordura no músculo está aumentado na obesidade e reduz com a perda de peso [Goodpaster e col. 2000]. Porcos submetidos à restrição alimentar na primeira semana de vida apresentaram um maior metabolismo oxidativo muscular, com maior utilização de lipídios [Lefaucher e col. 2003].

A explicação mais plausível para as poucas alterações musculares observadas é que um grau moderado de DEP em ratos, ocorrendo exclusivamente durante o período de aleitamento, não seria capaz de provocar alterações estruturais significativas em um músculo eutrófico ao nascimento. Apenas provocaria um retardo da maturação da musculatura esquelética, melhor detectado pela análise do tipo e distribuição das fibras musculares. Isto poderia significar um melhor prognóstico para uma recuperação nutricional sem seqüelas [Hegarty e Kim 1980]. Esta hipótese poderá ser melhor avaliada em outros estudos desenhados para este fim.

5.3 Variação Área, Tipos e Distribuição das Fibras Musculares

Os músculos gastrocnêmios dos ratos desnutridos apresentaram uma evidente redução do volume. Não foi realizada a pesagem dos mesmos, pois o corte distal das extremidades do músculo não é homogêneo, induzindo por si só variações significativas de peso que inviabilizariam a comparação.

Não foi possível determinar a presença ou não de uma redução do número total de fibras na seção transversa do músculo. O número de fibras contadas corresponde as fibras contidas inteiramente em um campo microscópico com aumento de 200 x da seção médio interna do músculo gastrocnêmio, incluindo pelo menos um fuso muscular. Pelas particularidades da falta de limites claros entre a porção medial do músculo gastrocnêmio e as variações no plano de corte, a opção de efetuar a medição de um número fixo de fibras de cada tipo em cada rato, implicaria que fatalmente teríamos que medir fibras fora da área em estudo – a cabeça medial do gastrocnêmio, onde ocorre o padrão em mosaico semelhante ao humano [Banker e Engel 1994, Brocke e Kaiser 1970, Sher e Cardasis 1976;], com a inclusão de fibras das áreas adjacentes, na quais a proporção de tipos de fibra é diferente, como por exemplo na zona externa do gastrocnêmio onde observa-se um acentuado predomínio de fibras tipo 2a [Sher e Cardasis 1976].

Sabe-se, que os estudos em humanos e ratos desnutridos não constaram redução do número de núcleos ou de fibras musculares (Tabela 1.1 e 1.2), exceto quando a desnutrição foi grave o suficiente para causar o óbito [Hansen-Smith e col. 1978 e 1979, Montgomery 1962, Reeds e col. 1978], permitindo inferir que também não ocorreu redução do número de fibras musculares nos ratos do grupo Desnutrido.

A medida da área secção transversa da fibra muscular, seja por métodos manuais ou digitais, é a forma mais precisa de dimensionar a área real da fibra muscular [Venema e Overweg 1974], pois as medidas obtidas utilizando maior diâmetro, menor diâmetros ou diâmetros ortogonais podem induzir a erros significativos [Edström e Torlegard 1969, Engel 1994, Kost e Kost 1982, Venema e Overweg 1974].

Como as fibras do grupo desnutrido eram menores, existiam mais fibras contidas neste campo microscópico. Os histogramas de distribuição dos vários tipos de fibras (Figuras 4.3 e 4.4) mostram apenas um desvio das curvas para a esquerda estatisticamente significativo ($p < 0,001$), conservando uma similaridade na forma das curvas de distribuição dos vários tipos de fibras entre os dois grupos estudados. Desta forma confirma-se ocorrer apenas uma redução da área das fibras do grupo Desnutrido e não uma significativa variação na frequência dos vários tipos de fibras.

Em porcos da índia desnutridos do aleitamento à 6ª semana de vida, com redução de até 35% do peso de corporal, também ocorreu uma redução significativa da

área de todos os tipos de fibras musculares, mantendo a proporção entre os vários tipos de fibras [Ward e Stickland 1993]. Este estudo utilizou uma metodologia semelhante a do nosso estudo e obteve resultados equivalentes. Deve-se ressaltar que o animal de experimentação utilizado, o porco da índia, apresenta um padrão de crescimento e maturação muito diferente do rato, o que eventualmente poderia alterar os resultados.

A correlação entre a diminuição da área das fibras musculares e o peso corporal não pode ser feita, pois a DEP afeta de forma diferente os vários órgãos e músculos, conforme o tipo, grau de gravidade e período de vida envolvido [Jackson e col. 1986]. Além desses fatores, o peso do animal e o tipo e grau de atividade influenciam significativamente a área e a diferenciação das fibras musculares [Yamaguchi e col. 1993]. A atividade dos ratos dos dois grupos em estudo era semelhante e dentro dos padrões usuais para a faixa etária, porém o peso corporal médio não o era.

A área menor das fibras musculares do tipo 2 do grupo desnutrido pode não ter sido causada diretamente pela DEP e sim ser um efeito indireto da DEP, retardando a transformação das fibras 2c (menores e mais primitivas) em 2a e 2b, que deveria ter sido concluída ao final da 4ª semana de vida [Brooke e col. 1971, Haltia e col. 1978, Kugelberg 1976, Nelson 1976]. Este efeito já foi comprovado em vários outros estudos de DEP em ratos e humanos [Dastur e col. 1979 e 1982, Ward e Stickland 1993]. O atraso do desenvolvimento pode ser localizado na interação músculo-nervo e em nervos periféricos [Kumar e col. 1977, Sachdev e col. 1981, Singh e col. 1976], nas raízes motoras [Sima 1974] ou ser decorrente de um retardo na maturação do sistema nervoso central [Dastur e col. 1979 e 1982, Nascimento e col. 1990, Tamer e col. 1997] devido a DEP.

No período neonatal precoce ocorre uma alteração no músculo, transformando as unidades motoras imaturas em unidades motoras eficientemente adaptadas, ocorrendo a supressão das isoformas de miosina neonatais e fetais com acentuação das formas adultas, e aumento do metabolismo glicolítico e redução do oxidativo. A transformação da miosina é devido à intervenção nervosa e sinalização hormonal, particularmente pela tiroxina. Condições que alterem este processo podem interromper ou retardar a diferenciação muscular [Ward e Stickland 1993].

A DEP, associada ou não ao hipotireoidismo, provoca uma alteração no metabolismo oxidativo, promovendo um predomínio das fibras oxidativas lentas (tipo 1) em detrimento das glicolíticas rápidas (tipo 2) [Lefaucher e col. 2003], concomitante a uma

redução da síntese protéica miofibrilar e sarcoplasmática [Fiorotto e col. 2000] e retardo na transformação das miosinas fetais de contração lenta [Hausman e Watson 1994], associado a um aumento pequeno, porém estatisticamente significativo, da proporção de fibras tipo 1 [Harrison e col. 1996, Lefaucher e col. 2003].. Este mecanismo adaptativo à DEP visa reduzir o crescimento da massa muscular, mitigando os efeitos da redução na concentração proteína miofibrilar decorrente da desnutrição, que é necessária para a maturação muscular normal [Fiorotto e col. 2000].

Os dados deste estudo sugerem que as alterações observadas na área média e na frequência de distribuição dos tipos de fibras musculares no grupo Desnutrido sejam decorrentes do retardo da maturação das fibras musculares induzido indiretamente pela DEP. A DEP ocasionaria um retardo na maturação do sistema nervoso e na interação músculo-nervo, além de um atraso na transformação das isoformas da miosina e favoreceria um metabolismo oxidativo lento nas fibras musculares. Estas mudanças seriam expressas por fibras tipo 2 menores, com preservação das fibras tipo 1.

O estudo da evolução das isoformas de miosina e da ação dos hormônios tireoidianos nas fibras musculares de ratos desnutridos no período de aleitamento, poderia elucidar melhor a maturação e diferenciação das fibras musculares nesta situação

Conclusões

1. O músculo gastrocnêmio dos ratos desnutridos exclusivamente durante o período de aleitamento não apresentou alterações histoquímicas e colorimétricas significativas em relação ao dos ratos eutróficos, exceto um menor acúmulo de lipídios nos ratos desnutridos.
2. As fibras musculares da região interna do músculo gastrocnêmio dos ratos desnutridos exclusivamente durante o período de aleitamento apresentaram uma redução significativa na área média da seção transversa das fibras musculares tipo 2.
3. A frequência de distribuição da área média da seção transversa das fibras do músculo gastrocnêmio coradas pela ATPase 4.3 de ratos desnutridos exclusivamente durante o aleitamento, demonstrou um desvio para a esquerda (menor área) significativo para as fibras tipo 2.

Referências

1. ACC/SCN (United Nations Administrative Committee on Coordination / Sub-Committee on Nutrition) in collaboration with International Food Policy Research Institute (IFPRI). Nutrition through the life cycle. In ACC / SCN in collaboration with IFPRI - Fourth Report on the World Nutrition Situation. Geneva 2000. p. 1-20.
2. Adibi SA, Krzywick BA, Morse EL, Amin PM, Allen ER. Oxidative energy metabolism in the skeletal muscle: biochemical and structural evidence for adaptive changes. J Lab Clin Med 1974; 83:548-562.
3. Wellcome Trust Working Party. Classification of infantile malnutrition [editorial]. Lancet 1970; II: 302-303.
4. Ariano MA, Armstrong RB, Edgerton VR. Hindlimb muscle fiber population of five mammals. J Histochem Cytochem 1973; 21:51-55
5. Banker BQ, Engel AG. Basic reactions of muscle. In: Engel AG, Franzoni-Armstrong C, editors. Myology. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, Inc.; 1994: 832-888.
6. Barbieri MA, Ricco RC, Gutierrez MP, Santoro JR – Crescimento e estado nutricional. In: Toledo Jr M, Tannuri V, editores. Suporte nutricional em pediatria. São Paulo: Atheneu; 1994: 25-35.
7. Bedy KS, Birzgalis AR, Mahon M, Smart JL, Wareham, AC - Early life under-nutrition in rats. 1 - Quantitative histology of skeletal muscles from underfed young and refed adult animal. Brit J Nutr 1982; 47: 417-431.

8. Bradley R, Fell BF. Myopathies in animals. In Walton J, editor. Disorders of voluntary muscle. 4th ed. Churchill Livingstone; 1982: 824-872.
9. Brooke MH, Kaiser KK - Muscle fibers types: how many and what kind? Arch Neurol 1970; 23: 369-379.
10. Brooke MH, Engel WK - The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fibers types. 1 - Adult male and female. Neurology 1969; 19: 221-233.
11. Brooke MH, Engel WK - The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types. 4. Children biopsies. Neurology 1969; 19: 591-605.
12. Brooke MH, Williamson E, Kaiser KK - The behavior of four fibers types in developing and reinnervated muscle. Arch Neurol 1971; 25: 360-366.
13. Brozanski BS, Daoood MJ, Laframboise WA, Watchko JF, Foley TP, Butler-Browne, Whalen RG, Guthrie WR, Ontel M. Effects of perinatal undernutrition on elimination of immature myosin isoforms in the rat diaphragm. Am J Physiol 1991 (suppl 1); 261: L49-L54.
14. Carpenter S, Karpatti G. General aspects of skeletal muscle. In: Carpenter S, Karpatti G, editores. Pathology of skeletal muscle. Oxford University Press; 2001. p. 28-62.
15. Carrazza FR. Desnutrição energético-protéica. In: Carrazza FR & Marcondes E, editores. Nutrição clínica em pediatria. Servier; 1991. p. 265-278.

16. Cavaliere, MJ, De Angelis RC, Macha N, Campos JV - Impaired differentiation of skeletal muscle fiber in developing undernourished rats. *Bolm Fisiol Anim Univ S Paulo* 1986; 10: 69-78.
17. Close RI. Dynamic proprieties of mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 1972; 52: 129-197.
18. Colton T. Inference on Means. In: Colton T, editor. *Statistics in medicine*. Chapter 4. Boston: Little, Brown and Company; 1974. p. 99-150.
19. Conover WJ. *Practical Nonparametrical Statistics* 2nd ed. New York, John Wiley & Sons, 1980.
20. Curless RG, Nelson MB - Developmental patterns of rat muscle histochemistry. *J Embryol Exp Morph* 1976; 36: 355-363.
21. Dastur DK, Daver SM, Manghani DK - Changes in muscle in human malnutrition; with an emphasis on the fine structure in protein-calorie malnutrition. In: Zimmerman M, editor. *Progress in neuropathology*, Vol. 4. New York: Raven Press; 1979. p. 299-318.
22. Dastur DK, Manghani DK, Osuntokun BO, Sourander P, Kondo K - Neuromuscular and related changes in malnutrition - A review. *J Neurol Sci* 1982; 55: 207-203.
23. Davidson AN, Dobbing J. Myelination as a vulnerable period in brain development. *B Med Bull* 1966; 22: 40-44.

24. Dobbing J. The later growth of the brain and its vulnerability. *Pediatrics* 1974; 53: 2-6.
25. Dubowitz V, Pearce AGE. Reciprocal relationship of phosphorilase and oxidative enzymes in skeletal muscle. *Nature (London)* 1960; 185: 7101-702
26. Dubowitz V. Definition of pathological changes seen in muscle biopsies. In: Dubowitz V, editor. *Muscle Biopsy. A practical approach*. 2nd ed. London: Ballière Tindall; 1985. p. 83-97.
27. Dubowitz V. In: Dubowitz V, editor. *Muscle biopsy. A practical approach*. 2nd ed. London: Ballière Tindall; 1985: 19-81.
28. Edström L, Torlegard K. Area estimation of transversely sectioned muscle fibers. *Z Wis Mikrosk* 1969; 3: 166-178.
29. Elder GB, Kakulas BA. Hystochemical and contractile property changes during human muscle development. *Muscle Nerve* 1993; 16: 1246-1253.
30. Engel AG. Quantitative morphological studies of muscle. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, editors. *Myology*. McGraw Hill, Inc; 1994. p. 1018-1045.
31. Ferrari BT - Desnutrição "A tragédia da Fome". *Rev Bras Clin Terap* 1986; 15: 9-18.
32. Florotto ML, Davis TA, Reeds PJ. Regulation of myofibrillar protein turnover during maturation in normal and undernourished rat pups. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 278: R845-854.

33. Glinnell AD. Trophic Interactions between Nerve and Muscle. In Engel AG, Franzoni-Armstrong C, editores. *Myology*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1994. p. 303-332.
34. Global Database on Child Growth and Malnutrition - Department of Nutrition for Health and Development, World Health Organization. Disponível em <http://www.who.int/nutgrowthdb>. Acessado em 20 de março de 2006.
35. Gomez F, Galvan RR, Frenk S, Munoz JC, Chavez R, Vasquez J. Mortality in second and third degree malnutrition. *J Trop Ped* 1956; 2: 77-83.
36. Goodpaster BH, Theriault R, Watkins SC, Kelley DE. Intramuscular lipid contents is increased in obesity and decreased in weight loss. *Metabolism* 2000; 49: 467-72.
37. Greene EC. Anatomy of the rat. Muscles. In: Transactions of the American Philosophical Society - Volume XXVII. New York: Hafner Publishing Co.; 1959. p. 59-83.
38. Guth L, Samaha FJ. Quantitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Exp Neurol* 1969; 25: 138-152.
39. Haliday D. Chemical composition of the whole body and individual tissues of two Jamaican children whose death resulted primarily from malnutrition. *Clin Sci* 1967; 33: 365-370.
40. Haltia M, Berlin O, Schucht H, Sourander P - Postnatal differentiation and growth of skeletal muscle fibers in normal and undernourished rats - A histochemical and morphometric study. *J Neurol Sci* 1978; 36: 25-29.

41. Hansen-Smith FM, Picou D, Golden MH - Grow of muscle fibers during recovery from severe malnutrition in Jamaican infants. *Br J Nutr* 1979; 41: 275-282.
42. Hansen-Smith FM, Picou D, Golden MH. Quantitative analysis of nuclear population in muscle from malnourished and recovery children. *Pediat Res* 1978; 12: 167-170.
43. Harrison AP, Tivev DR, Clausen T, Duchamp C, Dauncey MJ. Role of thyroid hormones in early postnatal development of skeletal muscle and it is implications for undernutrition. *Br J Nutr* 1996; 76: 841-845.
44. Hausman GJ, Watson R. Regulation of fetal muscle development by thyroxine. *Acta Anat (Basel)* 1994; 149: 21-30.
45. Hegarty PJ, Kim KO - Changes in skeletal muscle cellularity in starved and refed young rats. *Brit J Nutr* 1980; 44: 123-127.
46. Hoffmann R. Pobreza, insegurança alimentar e desnutrição no Brasil. *Estud Av* 1995; 9:159-172.
47. Howells KF, Hulme JL, Jordan TC - Sex-related differences in the response of fast and slow muscle to early undernutrition. *Res Exp Med (Berl)* 1979; 176: 137-141.
48. Howells KF, Mathews DR, Jordan TC - Effects of pre and perinatal malnutrition on muscles fibers from fast an slow rat muscles. *Res Exp Med (Berl)* 1978; 173: 35-40.

49. Jackson AA, Golden MN - Desnutrição proteico-energética: kwashiorkor y marasmo-kwashiorkor - Primeira parte. In: Nestlé Nutrition. Nutrión clínica en la infancia. New Cork: Vevey / Raven Press; 1986. p. 133-142.
50. Kelly AN, Rubistein NA - The diversity of muscle fiber types and its origin during development. In Engel AG, Franzoni-Armstrong C, editores. *Miology*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1994. p. 119-133.
51. Kfourir JR, Trindade CE, Nóbrega FJ, Tonete SS, Montenegro MR - Metabolismo (lipídios e proteínas) e histopatologia do cérebro de ratos recém-nascidos, jovens e adultos, submetidos à desnutrição protéico-calórica (tipo marasmo) e recuperação nutricional. *J Ped* 1977; 42: 19-27.
52. Kirkeby S, Garbarsch C. Agging affects different human muscle in various ways. An image analysis of the histomorphometric characteristics of fiber types in human masseter and vastus laterallis muscle from young and the very old. *Histol Histopathol* 2000; 15: 61-71.
53. Kost AL, Kost GJ. A comparison of fiber types and measurement techniques in the medial gastrocnemius and soleus muscle of rabbit. *Microscopica Acta* 1982; 86: 25-36.
54. Kugelberg E - Adaptative transformations of rat soleus units during growth. *J Neurol Sci* 1976; 27: 269-289.
55. Kumar A, Ghai OP, Singh N - Delayed nerve conduction velocities in children with protein-calorie malnutrition. *J Pediatr* 1977; 90: 149-153.

56. Lancellotti CL, Ponzoni ME, Schimidt B, Rasslan S - Estudo histoquímico da musculatura esquelética em doentes desnutridos. Rev Paul Med 1988; 106: 190-196.
57. Lefaucher L, Ecolan P, Barzic YM, Marion J, Le Dividich J. Early postnatal food intake alters myofiber maturation in pig skeletal muscle. J Nutr 2003; 133: 140-147.
58. Lopes J, Russel DM, Whitwell J, Jeejeebhoy, KN - Skeletal muscle function in malnutrition. Am J Nutri 1982; 36: 602-610.
59. Loughlin M. Morphometric Analysis of Muscle. In: Loughlin M, editor. Muscle biopsy. A laboratory investigation. Butterworth-Heinemann Ltda.: 1993. p. 195-228.
60. Johnson AJ. Applications of histochemistry in muscle pathology. In: Stoward PJ, Everson Pearse AG, editores. Histochemistry. Theoretical and Applied. Enzyme Histochemistry. Churchill Livingstone: 1991. Volume 3, p. 489-514.
61. Monckeberg F - Desnutrición proteico-energética: marasmo. In: Nutrición clínica en la infancia. Nestlé Nutrition. New York: Vevey / Raven Press; 1985. p. 121-132.
62. Montgomery RD. Muscle morphology in infantile protein malnutrition. J Clin Path 1962; 15: 511-521.

63. Nascimento OJ, Madi K, Guedes e Silva JB, Soares Filho PJ, Hahn, Couto B, Freitas MR. Considerações sobre o músculo estriado na desnutrição protéica. Estudo experimental em ratos albinos. *Arq Neuropsiquiatr* 1990; 48: 395-402.
64. Nassar AM, Abd-El-Hamid J, Sabour MS, Awwaad SA, Mahran, ZY. Ultra-structure of skeletal muscle in protein deficiency. *J Trop Pediatr Environ Child Health* 1974; 20: 77-81.
65. Nóbrega FJ, Tonete SQ, Trindade CP. Repercussões da Desnutrição Proteico Calórica no Sistema Nervoso Central. In: Nóbrega FJ, editor. *Desnutrição Intra Uterina e Pós-Natal*. São Paulo: Panamed Editorial; 1981. p. 325-338.
66. Oliveira FC, Oliveira AB, Schmidt B, Amancio OS. Desnutrição energética intrauterina em ratos: alterações músculo-esqueléticas na 1ª e 2ª gerações. *J Pediatr (Rio J)* 1999; 75: 350-356
67. Onis M, Frongillo EA, Blössner M. Is malnutrition declining ? An analysis for changes in levels of child malnutrition since 1980. *Bull WHO* 2000; 78: 1222-1233.
68. Ontko JA. Lipid Metabolism in Muscle. In: Engel AG, Franzoni-Armstrong C, editors. *Miology*, 2nd ed. McGraw-Hill, Inc; 1994. p. 832-888.
69. Padykula HA, Herman E. The specificity of the histochemical method of adenosine triphosphatase. *J Histochem Cytochem* 1955; 3: 170-195.

70. Palma D, Fisberg M. Desnutrição na Infância. 51º Curso Nestlé de Atualização em Pediatria, Blumenau, 1994.
71. Rede de Combate à Desnutrição Infantil. Perfil da Desnutrição. Caso Brasil - Prevalências e tendências. Disponível em <http://www.desnutricao.org.br/home.htm>. Acessado em 9 de junho de 2006.
72. Pullen AH. The distribution and relative sizes of three histochemical fiber types in the rat tibialis anterior muscle. *J Anat* 1977; 123: 1-19.
73. Reeds PJ, Jackson AA, Picou D, Poulter N. Muscle mass and composition in malnourished infants and children and changes seen after recovery. *Pediat Res* 1978; 12: 613-618.
74. Reichling TD, German RZ. Bones, muscles and visceral organs of protein-malnourished rats (*rattus norvegicus*) grow more slowly but of longer durations to reach normal final size. *J Nutr* 2000; 130: 2326-2332.
75. Rubinstein NA, Kelly AM. Development of muscle fiber specialization in the rat hindlimb. *J Cell Biol* 1981; 90: 128-144.
76. Sachdev KK, Taori GM, Pereira SM. Neuromuscular status in protein-calorie malnutrition. Clinical, nerve conduction and electromyographic studies. *Neurology* 1971; 21: 801-805.
77. Sandstedt P, Nordell LE, Henriksson KG. Quantitative analysis of muscle biopsies from volunteers and patients with neuromuscular diseases. A comparison between estimation and measuring. *Acta Neurol Scand* 1982; 66: 130-144.

78. Sarnat HB. Developmental disorders of muscle. In: Mastaglia FL & Walton J, editors. Skeletal muscle pathology. Churchill Livingstone; 1982. p. 140-160.
79. Sher J, Cardasis C. Skeletal muscle fibers types in the adult mouse. *Acta Neurol Scand* 1976; 54: 46-56.
80. Sima A. Studies on fibre size in developing sciatic nerve and spinal roots in normal, undernourished and rehabilitated rats. *Acta Physiol Scand* 1974; 406 (suppl):1-54.
81. Singh N, Kumar A, Ghai OP. Conduction velocity of motor nerves in children suffering from protein-calorie malnutrition and marasmus. *Electromyogr Clin Neurophysiol* 1976; 16: 381-392.
82. Song SK, Shimada N, Anderson PJ. Ortogonal diameters in the analysis of muscle fiber size and form. *Nature* 1963; 200: 1220-1221.
83. Soukup T, Vydra J, Cerny M. Changes in ATPase and SDH reations of the rat extrafusul and intrafusul muscle fibres after preincubation at different pH. *Hystochemistry* 1979; 60: 71-84.
84. Spence CA, Hansen-Smith FM. Comparison of the chemical and biochemical composition of thirteen muscles of the rata after dietary protein restriction. *Br J Nutr* 1978; 39: 647-658.
85. Staron RS, Hagerman FC, Hikida RS, Murray TF, Hostler DP, Crill MT, Ragg KE, Toma K. Fiber type composition of vast lateralis muscles of young men and woman. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 623-629.

86. Stein JM, Padykula HA. Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers of the rat. *Am J Anatomy* 1962; 110: 103-124.
87. Stephen DH. The embryonic origin of muscle. In: Engel AG & Armstrong CF, editores. *Myology. Basic and Clinical*. 2nd ed. McGraw Hill Inc.;1994. p. 3-73.
88. Tamaki T, Uchiyama S. Absolute and Relative Growth of Rat Skeletal Muscle. *Physiology & Behavior*, 1995; 57: 913-919.
89. Tamer SK, Misra S, Jaiswal S. Central motor conduction time in malnourished children. *Arch Dis Child* 1997; 77: 323-325.
90. Tawa NE, Goldberg AL. Protein and amino acid metabolism in muscle. In: Engel AG & Armstrong CF, editores. *Myology. Basic and Clinical*. 2nd ed. McGraw Hill Inc.;1994. p. 683-707.
91. Tonete SQ, Trindade CP, Nóbrega FJ. Repercussões da desnutrição proteico calórica no intra-uterina no sistema nervoso central. In: Nóbrega FJ, editor. *Desnutrição Intra Uterina e Pós-Natal*. São Paulo: Panamed Editorial; 1981. p. 237-252.
92. Venema HW, Overweg J. Analysis of the size and shape of cross sections of muscle fibers. *Med Biol Eng* 1974; 12: 681-692.
93. Wakata N, Kawamura Y, Kobayashi M, Niizuma M, Kinoshita M. Biochemical study of different conditions of type 2c muscle fiber in rat. *Int J Neurosci* 1992; 65:37-43.

94. Ward SS, Stickland NC. The effect of undernutrition in the early postnatal period on skeletal muscle tissue. *Br J Nutri* 1993; 69: 141-150.
95. Werneck LC. Estudo da biopsia muscular e suas relações com enzimas séricas e eletromiografias nas doenças neuromusculares (tese). Curitiba (PR), Universidade Federal do Paraná, 1991. p. 14-19.
96. Werneck LC. O valor da Biopsia Muscular em Neurologia. *Rev Bras Clin Ter* 1981; 10 (edição especial): 2-24.
97. White P, Cataneo D, Dauncey MJ. Postnatal regulation of myosin heavy chain isoform expression and metabolic enzyme activity by nutrition. *Br J Nutr* 2000; 84: 185-194.
98. World Health Organization. Alleviating protein-energy malnutrition. . Disponível em <http://www.who.int/nut/pem.htm>. Atualizado em 09/12/2002; 12:56:00. Acessado em 8 de março de 2003.
99. Yamaguchi A, Horio Y, Sakuma K, Katsuta S. The effect of nutrition on the size and proportion of muscle fiber types during growth. *J Anat* 1993; 182: 29-36.
100. Zlotikin SH. Neonatal nutrition. In: Linder ML, editor. *Nutritional biochemistry and metabolism with clinical applications*. 2nd ed. Appleton & Lange; 1991. p. 349-371.